

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

**TRASPLANTE DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL CON CO-
INFUSIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE
DONANTE AUXILIAR, COMO TRATAMIENTO DE
HEMOPATÍAS NEOPLÁSICAS EN ADULTOS.**

**RECONSTITUCIÓN HEMATOPOYÉTICA Y DEL SISTEMA
INMUNITARIO Y RESULTADOS CLÍNICOS.**

ELENA MAGRO MAZO

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2007

ELENA MAGRO MAZO

TÍTULO:

**TRASPLANTE DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL CON CO-
INFUSIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE
DONANTE AUXILIAR, COMO TRATAMIENTO DE
HEMOPATÍAS NEOPLÁSICAS EN ADULTOS.**

**RECONSTITUCIÓN HEMATOPOYÉTICA Y DEL SISTEMA
INMUNITARIO Y RESULTADOS CLÍNICOS.**

DIRECTOR:

Prof. Manuel N. Fernández Rodríguez

TUTORA:

Dra. Rosa Gonzalo Daganzo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

2007

ÍNDICE

INDICE

I) INTRODUCCIÓN.....	1
II) ANTECEDENTES.....	2
1. Desarrollo inicial del TSCU (hasta 1998).....	2
2. Resultados de los TSCU realizados al modo convencional, una sola unidad administrada tras acondicionamiento intensamente mieloablativo e inmunosupresor.....	3
3. Ventajas y limitaciones del empleo clínico de TSCU al modo convencional	11
4. Posibilidades de mejora de la reconstitución hematopoyética tras los TSCU.....	12
4.1.Acondicionamientos de intensidad reducida (TSCU-IR).....	13
4.2.Expansión “ex-vivo” de los progenitores hematopoyéticos de la SCU	14
4.3.Manipulación de la expresión de moléculas de adhesión o anidamiento.....	15
4.4.Trasplante con dos unidades de SCU.....	15
4.5.Inoculación vía intra-medular o intraósea.....	16
4.6.Estrategia de “Trasplante dual”	17
5. Reconstitución del sistema inmune tras el TSCU.....	17
III) HIPOTESIS DE TRABAJO	23
IV) OBJETIVOS DEL ESTUDIO	26

V) PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
1. Pacientes del estudio.....	27
2. Procedimientos de tipaje HLA de pacientes, donantes auxiliares y unidades de SCU.....	27
3. Búsqueda y selección de las unidades de SCU.....	27
4. Procesamiento de las unidades de SCU e infusión.....	28
5. Células auxiliares del donante voluntario y selección del donante.....	29
6. Procesamiento de los PHM e infusión.....	30
7. Controles de productos de trasplante, SCU y PHM.....	30
8. Procedimiento del trasplante.....	30
8.1. Acondicionamiento de los pacientes receptores.....	30
8.2 Profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped.....	31
8.3 Estimulación del prendimiento.....	32
8.4 Tratamiento de soporte y otros tratamientos para diferentes eventos.....	33
8.5 Monitorización de colonizaciones e infecciones.....	34
9. Evaluación del trasplante.....	34
9.1 Evaluación del prendimiento mieloide y plaquetario.....	34
9.2 Evaluación de la reconstitución del sistema inmune.....	35
9.3 Evaluación del quimerismo.....	37
9.3.1 Definiciones.....	38
9.3.2 Aislamiento de subpoblaciones linfocitarias.....	39
9.3.3 Análisis de quimerismo en distintas poblaciones celulares.....	40
9.4 Determinación de las moléculas de escisión del reordenamiento del receptor de las células T (TRECs).....	41
10. Métodos de análisis estadísticos.....	42

VI) RESULTADOS	45
1. Características de los pacientes incluidos en el estudio.....	45
2. Datos de la celularidad de las unidades de SCU trasplantadas.....	47
3. Características de los donantes de células auxiliares.....	48
4. Relación de compatibilidad HLA entre pacientes receptores, unidades de SCU trasplantadas y PHM co-infundidos.....	50
5. Recuperación de granulocitos y plaquetas tras el trasplante.....	51
6. Recuperación del sistema inmune.....	58
7. Complicaciones tóxicas.....	65
8. Complicaciones infecciosas.....	65
9. Incidencia de la EICH.....	69
10. Recidivas.....	70
11. Supervivencia y mortalidad relacionada con el trasplante.....	70
VII) DISCUSIÓN.....	76
VIII) CONCLUSIONES.....	86
IX) BIBLIOGRAFÍA.....	88

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Sigla o Abreviatura	Significado
ADN	Acido desoxirribonucleico
ALG	Globulina Anti-linfocitaria
AraC	Citosina Arabinósico
ATG	Globulina Anti-timocítica
Bus	Busulfán o Busilvex ^R
CAL	Contaje absoluto de linfocitos en sangre periférica
CAN	Conteo Absoluto de Neutrófilos en sangre periférica
CAN-SCU	Conteo Absoluto de Neutrófilos derivados del TSCU
CE	Comunidad Europea
CFU	Unidad (célula) Formadora de Colonia
	Unidad (célula) Formadora de Colonia de Granulocitos y
CFU-GM	Monocitos
CIBTR	Center for Internacional Bone Marrow Transplant Registry
CIH	Ácido clorhídrico
CIK	Cloruro potásico
Cl ₂ Mg	Cloruro magnésico
ClNa	Cloruro sódico
CMNs	Células Mononucleadas
CMV	Virus Citomegálico
CNT	Células Nucleadas Totales
CsA	Ciclosporina A
CTX	Ciclofosfamida (Genoxal)
D.O.	Densidad óptica
ECD	R Ficoeritrina-Texas Red ^R -X
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EH	Enfermedad de Hodgkin
EICH	Enfermedad (o Efecto) Injerto Contra Huésped
EICT	Efecto Injerto Contra Tumor
EVO	Enfermedad Venó Oclusiva o Síndrome de Obstrucción Sinusoidal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Flu	Fludarabina
FMO	Fracaso Multi Orgánico
g	gramos
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas
GMP	Buena Práctica Manufacturera
h	Horas
HLA	Complejo principal de histocompatibilidad
HS	Heparina sódica
IBMTR	International Bone Marrow Transplant Registry
IC	Intervalo de confianza
Ig	Inmunoglobulina
ICT	Irradiación Corporal Total
Kg	kilogramo
KM	Kaplan-Meier
LA	Leucemia Aguda

LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LNH	Linfoma No Hodgkin
M	Molar
min.	Minutos
mL.	Mili-litros
MO	Médula Ósea
MRT	Mortalidad Relacionada con el Trasplante
MSC	Cls Estromales Multipotenciales o "Cls Madre Mesenquimales"
N	Tamaño de la muestra
nm	Nanómetros
NK	Células "Natural Killer" (citotóxicas naturales)
PBS	Tampón fosfato salino
PC5	R Ficoeritrina-Cianina 5.1
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
PE	Ficoeritrina
PH	Progenitores Hematopoyéticos
PHM	Progenitores Hematopoyéticos Movilizados
QCC	Quimerismo Completo del TSCU
QC-D	Quimerismo Completo Doble (donante auxiliar y SCU)
QC-DA	Quimerismo Completo del Donante Auxiliar
QM	Quimerismo Mixto (de paciente y donante auxiliar y/o SCU)
QM-p	Quimerismo Mixto precoz (sin QCC previo)
QM-t	Quimerismo Mixto tardío
RA	Reconstitución de Hematopoyesis Autóloga
RC	Remisión Completa
RC1	Primera Remisión Completa
RC2	Segunda Remisión Completa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RSCA	"Reference strand mediated conformation analysis"
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
SDRA	Síndrome de Distress Respiratorio Agudo
SDS	Duodecil sulfato sódico
	"signal-joint" Fragmentos Circulares de Escisión del ADN de los
sjTRECS	Receptores T
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SP	Sangre Periférica
SRC	Células reconstituidoras de hematopoyesis en ratones SCID/NOD
STR	Secuencias ADN de microsatélites ("Short Tandem Repeats")
TMO	Trasplante de Médula Ósea
TPH	Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos
TRECS	Fragmentos Circulares de Escisión del ADN de los Receptores T
T-reg	Células T reguladoras (CD4+CD25+)
TSCU	Trasplante de Sangre de Cordón Umbilical
TSCU-IR	TSCU con acondicionamiento de Intensidad Reducida
µg.	Microgramos
µL	Microlitros
°C	Grado centígrado

INTRODUCCIÓN

I) INTRODUCCION

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) tiene la finalidad de restablecer la función medular en pacientes con médula ósea enferma, incapaz de mantener una hematopoyesis compatible con la vida bajo tratamientos convencionales. Puede ser la terapia de elección para muchos pacientes con enfermedades hematológicas, principalmente neoplásicas. La modalidad del trasplante de progenitores de sangre de cordón umbilical (TSCU) de donante alogénico tiene en la actualidad su indicación principal para el tratamiento de enfermedades susceptibles de TPH: procesos onco-hematológicos, síndromes de insuficiencia medular (como anemia aplásica adquirida) y distintas enfermedades metabólicas constitucionales (como la anemia de Fanconi, hemoglobinopatías, tesarismosis e inmunodeficiencias congénitas).

Actualmente, la mayor parte de los TSCU que se realizan son de donante no relacionado con 0-3 diferencias en el sistema mayor de histocompatibilidad (HLA), en su mayoría en pacientes pediátricos. Sólo una mínima parte se realizan con unidades con 6/6 identidades en los loci HLA A y B a nivel antigénico (determinaciones por métodos serológicos o de “baja resolución”) y DRB1 a nivel alélico (determinaciones por métodos moleculares de alta resolución), realizándose la gran mayoría con unidades con 1-2 diferencias. Los TSCU de donante familiar son de realización casi exclusiva en la práctica pediátrica, siendo mayoritariamente trasplantes con identidad HLA completa (geno-idénticos) y en menor número de donantes haplo-idénticos o con 1-2 diferencias HLA en A, B y DRB1.

Por su tolerancia de diferencias HLA el TSCU de donante alogénico es una opción atractiva para hacer el TPH aplicable a una mayor proporción de pacientes, motivo por el que es objeto de intensa actividad investigadora por parte de diferentes grupos, tratando de resolver lo que han sido sus principales limitaciones: prendimiento tardío con alta tasa de rechazos y alta tasa de mortalidad precoz relacionada con el trasplante. En el presente estudio se muestran los resultados, altamente favorables respecto a estas cuestiones, obtenidos mediante la estrategia original de co-infundir un limitado número de progenitores hematopoyéticos movilizados de un donante auxiliar sin restricciones HLA.

ANTECEDENTES

II) ANTECEDENTES

1.- Desarrollo inicial del TSCU.

La presencia de progenitores hematopoyéticos (PH) en la sangre de cordón umbilical (SCU) humana fue inicialmente descrita en 1974 por KNUDTZON.¹⁻³ Tras ello, el grupo de la Universidad de Indiana (USA) realizó estudios que llevaron a la idea de que la SCU podría servir como fuente de progenitores hematopoyéticos (PH) para trasplante, la que según H. Broxmeyer fue inicialmente propuesta en 1983 por Boyse, si bien no fue objeto de publicación. Esta posible aplicación aparece, en cambio, claramente propuesta entre las conclusiones de la tesis doctoral de J. Besalduch (Universidad de Valencia, Junio 1985).

El TSCU fue introducido en la clínica en 1988 con la realización del primero en la Unidad de Trasplante del Hospital San Luis de Paris, bajo la dirección de E. Gluckman.⁴ Fue realizado a un niño de 6 años con anemia de Fanconi procedente de Carolina del Norte (USA) utilizando la SCU recogida por el equipo dirigido por H. Broxmeyer de un hermano HLA idéntico que no presentaba alteraciones clínicas ni cromosómicas de la enfermedad de Fanconi. Se consiguió una completa reconstitución hematológica y del sistema inmune con las células del donante, sin que el paciente desarrollara enfermedad injerto contra huésped (EICH).

La etapa inicial de desarrollo del TSCU podemos considerar que se extiende hasta 1992. Durante este período todos los TSCU que se realizaron lo fueron en pacientes pediátricos de donante familiar, sin y con diferencias HLA, dando ocasión a que se observara una baja incidencia y gravedad de EICH, lo que dió lugar a que se empezaran a constituir Bancos de SCU. Esto fue liderado por P. Rubinstein, en Nueva York, que desarrolló protocolos para la colecta, procesamiento y congelación de las unidades de SCU, siendo su iniciativa pronto seguida (años 1992-3) por la creación de los bancos de Dusseldorf, Paris y Milán y, muy pronto después, por la de otros, entre ellos el de Barcelona, que fue el primero establecido en España, bajo la dirección del Dr. J. García.

Fue en 1993 cuando Kurtzberg y col. realizaron el primer trasplante de donante no relacionado HLA-no idéntico con una unidad del banco de Nueva York ^{5,6}, consiguiendo prendimiento hematopoyético de las células de SCU a las seis semanas, con desarrollo de EICH cutáneo grado I. En 1995 se constituyó, bajo el liderazgo de Gluckman, el grupo *Eurocord* en el que se integraron equipos de trasplante hematopoyético de diferentes países europeos (Francia, Italia, España, Portugal, Alemania, Polonia, Bélgica, etc) y también no europeos (Brasil, Argentina, México y otros). Su principal objetivo fue el establecer un amplio Registro Internacional de pacientes trasplantados en diferentes centros, en pacientes con distintas patologías y con diferentes protocolos, que sirviera de base para analizar, sobre la base de estudios retrospectivos, la influencia de distintos factores sobre los resultados de TSCU, de modo que se facilitara el perfeccionamiento de la aplicación clínica del procedimiento y el desarrollo de estudios prospectivos, tanto unicéntricos como cooperativos.

2.- Resultados de los TSCU realizados al “modo convencional”: una sola unidad administrada tras acondicionamiento intensamente mielo e inmunosupresor

La gran mayoría de los estudios clínicos iniciales de TSCU, tanto de donante familiar como de donante no relacionado, se realizaron fundamentalmente en pacientes pediátricos. ⁶

En 1996 Kurtzberg y col. publicaron un estudio de TSCU no emparentado correspondiente a 25 pacientes con una mediana de edad de 7 años (0.8-23.5), 19 de ellos con enfermedades hematológicas malignas y el resto con diagnósticos como Anemia Fanconi, Síndrome de Kostmann, Neuroblastoma, Enfermedad de Lesch-Nyhan e Inmunodeficiencia variable común, de los que en 24, la unidad trasplantada tenía 1-3 disparidades HLA. ⁷ Se obtuvo prendimiento en 23 con desarrollo de EICH aguda grado III en 2 y de EICH crónica también en 2. Con un seguimiento mínimo de 100 días y una mediana de 12 meses y medio, la supervivencia global fue del 64% y la libre de enfermedad (SLE) fue del 48%. Las importantes conclusiones extraídas de este estudio fueron las de la posibilidad de conseguir reconstitución hematopoyética con TSCU de unidades de donantes no relacionados con relativo bajo riesgo de EICH grave a pesar de

presentar disparidades en HLA, así como mayor probabilidad de evolución favorable del trasplante a mayor número de células trasplantadas.

En 1997, el grupo *Eurocord* publicó un estudio retrospectivo de 143 TSCU realizados en 45 centros entre los años 1988-1996 a pacientes con una media de edad de 6 años (rango 0.2-45) con distintos diagnósticos: 95 con enfermedades hematológicas malignas, 26 con insuficiencia medular, 8 con hemoglobinopatías y 14 con otras patologías constitucionales.⁸ La mediana de tiempo de prendimiento de neutrófilos fue de 30 días (rango 8-56) y la del prendimiento de plaquetas de 56 días (rango 9-180). En cuanto a las supervivencias, fallecieron 30 de los 78 con TSCU de donante relacionado [8 por rechazos, 5 por infección, 2 por enfermedad veno-oclusiva hepática (EVO), 1 por EICH, 1 por fallo cardíaco, 2 por fallo multiorgánico (FMO) y 11 por recaídas de enfermedad neoplásica] y 30 de los 65 que recibieron TSCU de donante no relacionado [4 por rechazo, 10 por infecciones, 7 por neumonitis intersticiales de etiología no definida, 2 por síndrome de distress respiratorio agudo (SDRA), 3 por EVO, 2 por fallo cardíaco, 4 por EICH, 1 hemorragia y 5 por recidiva de la enfermedad neoplásica]. Es decir, fueron más frecuentes los fallecimientos por causas relacionadas con el trasplante (MRT) que los fracasos por recidiva. La conclusión derivada de estos resultados fue la de que, a pesar de la alta MRT, el TSCU podía ser una alternativa de TPH tanto para niños como para adultos sobre todo, en el caso de donante y receptor relacionados.

En 1998, P. Rubinstein y col. publicaron los resultados de un estudio retrospectivo de TSCU en 562 pacientes con edades entre 2 y 58 años realizados entre los años 1992 y 1998 por motivo de LLA, LMA o LMC. En el 17% de los casos los pacientes tenían enfermedad en estadios iniciales, y sólo un tercio con enfermedad avanzada. El 45% había recibido un TMO previo (autólogo en el 25%). La incidencia acumulativa máxima de prendimiento de granulocitos fue 0.81 a los 42 días (mediana de 28) y la de recuperación de las plaquetas de 0.85 a los 180 días (mediana de 90). La rapidez en el prendimiento mieloide se asoció al contenido de células nucleadas totales (CNT) de la SCU. La EICH aguda grave (grados III-IV) se observó en el 23% de los pacientes y

EICH crónica en el 25%. La incidencia de recaída entre los pacientes con leucemia fue del 9% en los primeros 100 días, 17% a los seis meses y del 26% al año del trasplante.

Esto se relacionó con el tipo de leucemia y estadio de la enfermedad así como, con la intensidad de la EICH. Este estudio vino a corroborar la utilidad de la SCU como fuente de PH para la reconstitución de la hematopoyesis mediante alo-trasplante.⁹

Uno de los estudios sobre TSCU de especial trascendencia fue el publicado por el grupo *Eurocord* en el año 2000, en el que se analizaron retrospectivamente los resultados obtenidos en 2052 pacientes con trasplantes de médula ósea (TMO) HLA idéntico entre los años 1990 y 1996 y en 113 receptores de TSCU HLA idénticos, realizados en el mismo periodo de tiempo.¹⁰ La conclusión fue que, en el TSCU había prendimiento mieloide más tardío que el TMO, pero con menor incidencia de EICH aguda y crónica, y sin diferencias en la supervivencia a los tres años.

En los años 2001 y 2002, E. Wagner y col. publicaron resultados favorables en la mayoría de los TSCU realizados a pacientes con enfermedades hematológicas malignas (LLA, LMA, LMC, LNH, EH) y no malignas [anemia aplásica adquirida grave, anemia de Fanconi, síndromes mielodisplásicos (SMD), inmunodeficiencias, trastornos metabólicos y osteopetrosis] en pacientes pediátricos (edades entre 0,2 y 77 años con mediana de 7,4) e incluso en los realizados con disparidades en dos antígenos HLA.^{11,12} Los tiempos de prendimiento de neutrófilos y plaquetas observados fueron más largos que en los TMO, siendo baja la incidencia de la EICH grave, sin pérdida de efecto injerto contra tumor (EICT). En estos estudios se corroboró la importancia del número de CNT/Kg de la unidad trasplantada y se señaló, además, la influencia del número de células CD34+ Kg infundidas, sobre el prendimiento y la supervivencia. Estos resultados añadieron fundamento a la posibilidad de considerar el TSCU no relacionado como opción para TPH en niños carentes de donante compatible.

Por su parte, el grupo *Eurocord* publicó en el año 2002 un nuevo estudio relativo a 102 niños con leucemia aguda (LA) tratados con TSCU (42 familiares y 66 no familiares). Se obtuvo el prendimiento de neutrófilos en el 84% de los pacientes, con una mediana de tiempo de prendimiento de 23 días (rango 9-54), observándose que el prendimiento

se correlacionaba con el número de CNT precongelación de las unidades trasplantadas, respecto al peso del receptor. Los tiempos de prendimiento fueron significativamente

más cortos y tasas de prendimiento más altas en los trasplantes en los que se utilizaron unidades con mayor número de CNT/Kg mayor que la mediana de $3.7 \times 10^7/\text{Kg}$. La SLE fue del 41%.

En otro estudio de *Eurocord* (año 2003) se analizaron los resultados de TSCU de donante familiar en 44 niños con hemoglobinopatías (33 con talasemia y 11 con anemia drepanocítica) y una mediana de edad de 5 años (rango 1-20). Las SLE a dos años en uno y otro proceso fueron, respectivamente, de 79% y 90%, con baja incidencia en ambos de EICH en ambos.¹³⁻¹⁵ En el mismo año, se publicó otro estudio, también del grupo *Eurocord*, de TSCU no relacionado en 95 niños con LMA: 20 en primera remisión (RC1), 47 en segunda remisión completa (RC2) y 28 en estadios avanzados, 29 de ellos con criterios citogenéticos de mal pronóstico. La mayoría recibieron TSCU con 1 o 2 diferencias en HLA. La incidencia acumulada máxima (IAM) de recuperación de neutrófilos fue del 78 ($\pm 4\%$), la EICH aguda del $35 \pm 5\%$ y la MRT a los 100 días del 20 ($\pm 4\%$). La SLE a los dos años del conjunto de los pacientes fue del 42% ($\pm 5\%$), del 59% ($\pm 11\%$) en los casos trasplantados en RC1, 50% ($\pm 8\%$) en los trasplantados en RC2 y del 21% ($\pm 9\%$) en casos sin RC.¹⁶

En lo que respecta a la aplicación del TSCU en adultos, son de destacar distintas publicaciones aparecidas en el año 2001. Laughlin, Rubinstein y col. publicaron resultados en 68 pacientes (mediana de edad 31.4 años).¹⁷ El 71% recibió unidades con 1-3 de 6 posibles disparidades en HLA (A, B, DRB1). Hubo prendimiento de granulocitos en el 90%, pero con tiempos de prendimiento más tardíos (mediana 27, rango 13-59) que en los TMO no relacionados. Los tiempos de prendimiento de plaquetas variaron entre 35 y 142 días, con mediana de 58. El 20% de los pacientes presentó EICH aguda grados III o IV y el 30 % EICH crónica. La MRT fue alta (47% antes de los 100 días), siendo las infecciones la principal causa de muerte, seguida de la toxicidad del acondicionamiento. Con una mediana de seguimiento de 22 meses, la supervivencia fue del 26% y se observó correlación entre alto número de células CD34+ en la unidad infundida y mejores resultados.

Resultados ligeramente mejores fueron aportados en el año 2001 por M. Sanz en un grupo de 22 pacientes con enfermedades hematológicas malignas y mediana de edad de

29 años (rango 18-46). La recuperación de granulocitos y plaquetas se alcanzó tras medianas de 22 y 69 días, respectivamente, con una SLE del 53% al año, observando mejores resultados en los pacientes más jóvenes (SLE del 73%).¹⁸

En el año 2002, autores japoneses publicaron un estudio en el que se compararon datos de 8 pacientes adultos con LA y TSCU con disparidad en HLA, con otros 8 pacientes también con LA que recibieron TMO no familiar HLA idéntico.¹⁹ Ambos grupos recibieron los mismos acondicionamientos, profilaxis de EICH y tratamiento de soporte. Los que recibieron TSCU tuvieron una recuperación hematológica más tardía. La incidencia de EICH aguda fue similar en ambos grupos y fue más alta la incidencia de EICH crónica en los que recibieron TSCU. La SLE a los dos años fue similar: 85% para TSCU y 75% para los TMO.

En el año 2003, Long y col publicaron resultados de TSCU en un grupo de 57 pacientes adultos con patologías oncohematológicas (LMC, LMA, LLC, LLA, LNH...) de alto riesgo. Las medianas de tiempo de recuperación de neutrófilos y plaquetas fueron de 26 y 84 días, con una alta MRT: 50% en los 100 primeros días, de las cuales 21 fueron debidas a infecciones.²⁰ La supervivencia a los tres años fue sólo del 19%. Un año más tarde, el grupo japonés publicó un estudio realizado a 18 pacientes con LMA a los que se administró tratamiento acondicionante con ciclofosfamida (CTX), arabinósido de citosina (AraC) e irradiación corporal total (ICT) y que recibieron unidades con una mediana de CNT de $2,5 \times 10^7/\text{Kg}$ (rango 1,16-5,29).²¹⁻²³ El prendimiento de granulocitos se alcanzó con una mediana de 23 días (rango 16-41), observándose EICH de grados II-IV en 11 pacientes. La SLE a los dos años fue del 76%.

EL grupo Americano del Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea (IBMTR) publicó en 2004 resultados de un estudio comparativo relativo a pacientes adultos trasplantados en centros estadounidenses para tratamiento de leucemia (LLA, LMC, SMD, LMA). Fueron 150 los pacientes que recibieron TSCU con 1-2 diferencias en HLA (A, B, DRB1) y mediana de CNT infundidas de $2,2 \times 10^7/\text{Kg}$ (ligeramente

menor que las recibidas por los pacientes de los estudios anteriores), mientras que 450 recibieron un TMO, en 367 de donante no familiar HLA idéntico (6/6) y en 83 con una

diferencia antigénica en HLA.²⁴ La MRT por infecciones fue mayor en los receptores TSCU, siendo en cambio menor, la incidencia de EICH aguda para los receptores de TSCU no idéntico que para los que reciben TPH de MO no idéntica (0,66, IC 95%, 0,44 a 0,99, P= 0,04). Las SLE fueron respectivamente, 23%, 19% y 33%. En términos de supervivencia global los resultados fueron mejores para el TMO no familiar y HLA idéntico y, similares entre los receptores de TSCU y los de TMO con una diferencia antigénica HLA.

Por su parte, el grupo *Eurocord* publicó al mismo tiempo, un estudio retrospectivo comparando los resultados de un grupo de 98 pacientes adultos con LA y TSCU no familiar, con 1-2 diferencias antigénicas, con los de un grupo de 584 adultos con similares patologías, que recibieron TMO de donante HLA idéntico no familiar.²⁵ La recuperación de neutrófilos fue más tardía en grupo de TSCU (26 vs 19) entre los que hubo fallo del injerto en un 20%, frente a un 7% de los receptores de TMO. La incidencia de EICH grado II-IV fue del 26% en el grupo de TSCU y del 38% en los receptores de TMO, siendo similar en ambos grupos la tasa de recidivas y la SLE a los 2 años, concluyéndose que los resultados de ambos tipos de trasplante eran similares.

Junto a estos dos últimos trabajos se publicó como editorial por M. Sanz un análisis crítico de los resultados de ambos estudios y una evaluación del estado del arte del TSCU, concluyendo el autor que los resultados del TSCU podrían mejorarse utilizando unidades con $>2 \times 10^7$ CNT/Kg de peso del receptor y $< 3/6$ diferencias en HLA.²⁶

Por otra parte, también en 2004, el grupo japonés de Takahashi publicó un nuevo estudio unicéntrico comparando los resultados de TSCU no familiar en un grupo de 68 adultos con los de otro grupo de 45 adultos receptores de TMO no familiar, afectados de LMA, LLA, LMC, SMD y LNH.²⁷ El 94% de los TSCU recibieron $>2.0 \times 10^7$ CNT/Kg. El prendimiento de plaquetas y granulocitos fue más tardío en el grupo de TSCU y la MRT fue del 19% en los TSCU y del 29% en los receptores de TMO. La SLE a los dos años fue del 74% y 44% respectivamente. Estos resultados son claramente superiores a

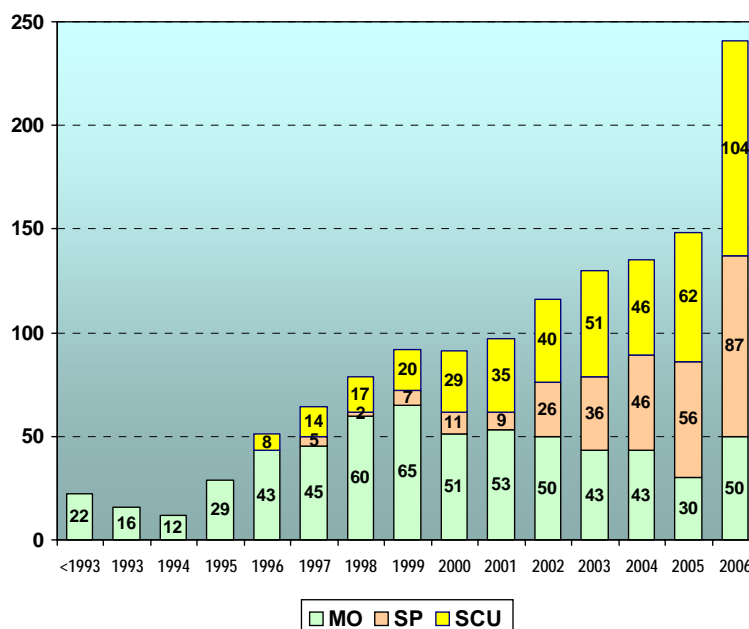
los descritos por los grupos cooperativos del *IBMTR* y de *Eurocord*. Los factores influyentes sobre estas diferencias de resultados podrían incluir que en el estudio japonés

podría ser mayor la homogeneidad genética entre pacientes y donantes y menor peso corporal de los receptores dando lugar a un mayor número de células PH/Kg.

En una publicación del grupo del Hospital Universitario La Fé de Valencia, también del año 2004, referente a 20 pacientes con LMC (mediana de edad de 32, rango 16-46) que recibieron TSCU, con 5/6 identidades HLA en 7 casos y 4/6 en 13, con medianas de CNT de $1,8 \times 10^7$ /Kg (rango 1,2-4,9) y de CD34+ de $0,8 \times 10^5$ /Kg (rango 0.3-2.2), las medianas de tiempo de recuperación de neutrófilos y plaquetas fueron de 22 y 69 días, respectivamente.²⁶ En este estudio se observó correlación directa con el número de CFU-GM y CD34+ infundidas y, a los tres años de seguimiento, la SLE fue del 40% en el conjunto de todos los pacientes y del 60% en el grupo de edad hasta los 30 años. Los autores concluyeron [en fecha anterior a la constatación de la eficacia de los fármacos inhibidores de la *tirosín kinasa* (*Glivec*) para el tratamiento de la LMC], que el TSCU no familiar podía ser considerado como una opción de trasplante para pacientes jóvenes con LMC en fase crónica sin donante familiar o médula ósea no relacionada.

En los últimos años (2004-2007) el número de TSCU de donante familiar, realizados ha permanecido estable, en tanto que se ha producido un importante incremento del uso de TSCU no familiar para el tratamiento de adultos, aunque no por igual en todos los países. Mientras que en países como Alemania y Reino Unido sigue siendo baja la utilización de TSCU, su número ha aumentado considerablemente en otros países, entre los que están USA, Japón, Francia, Italia y España, país el nuestro en el que en el año 2006 el 55.6% de los TPH de donante no relacionado fueron TSCU (Fig. 1). Este incremento ha ocurrido en paralelo con la referida mejoría progresiva de resultados publicados en los últimos años por los distintos grupos con mayor experiencia en el uso de TSCU, que han llegado a considerar el TSCU no familiar como opción comparable a la de TPH de otras fuentes (MO y SP) de donantes no relacionados, con la perspectiva que, además, es probable que los resultados clínicos de TSCU puedan verse mejorados a corto o medio plazo por el desarrollo de nuevas estrategias actualmente en fase de investigación y desarrollo por parte de diferentes grupos.

Memoria anual REDMO, 2006.-

**Figura 1.- Número de TPH con células de distintas fuentes**

Incremento progresivo en la última década del número de TSCU realizados en España 55,6% de los 241 TPH realizados en 2006 fueron de TSCU

Entre las publicaciones más recientes son de destacar la del Registro *Eurocord* referente a un total de 2310 TSCU realizados entre los años 1988 y octubre-2005. Entre 2004-2005 el número de TSCU no familiar fue de 1320 niños y 693 adultos, la mayoría con enfermedades malignas (962), con resultados equiparables al TMO HLA idéntico no familiar.²⁸ Por otra parte, Wagner y col. han publicado recientemente un estudio relativo a niños (menores de 16 años) con LA comparando los resultados de un grupo de 503 tratados con TSCU (HLA idéntico en 35, no idéntico con disparidad en un antígeno en 201 y no idéntico con disparidad en dos antígenos en 267) con los de 282 que recibieron TPH (HLA idéntico en 116 y no idéntico en 166), en el que fueron ventajosos los correspondientes a TSCU, sobre todo en lo referente a SLE.²⁹

3.- Ventajas y limitaciones del empleo clínico de TSCU al modo convencional

De estos estudios se concluye que, en comparación con otras fuentes de progenitores hematopoyéticos, el TSCU presenta una serie de ventajas como son:

- 1.-Rápida disponibilidad de las unidades presentes en los inventarios de la red internacional de Bancos acreditados ya que es posible conseguir el producto a trasplantar en cuestión de 2-3 semanas, en contraposición con el plazo habitualmente superior de 2-3 meses que se precisa para poder obtener las células de MO o de SP de un donante voluntario no familiar HLA compatible.
- 2.-Mayor probabilidad de conseguir un producto para trasplante para los pacientes que no tienen un donante familiar HLA idéntico, dada la relativamente baja incidencia y gravedad de la EICH aguda en trasplantes hasta con 2 disparidades de las 6 posibles en HLA A y B (a nivel antigénico) y DRB1 (a nivel alélico).
- 3.-Importante efecto inmunoterápico antitumoral, según puede colegirse del hecho de que las tasas de recidivas no son superiores a los de los trasplantes de progenitores de otras fuentes.
- 4.-Bajo riesgo de transmisión de infecciones
- 5.-Nulo riesgo para el donante
- 6.- Posibilidad de potenciar en los inventarios de los Bancos la proporción de unidades de minorías étnicas, de modo que pueda verse facilitada la posibilidad de beneficiar a pacientes subsidiarios de trasplante pertenecientes a las mismas.

Por el contrario, los TSCU realizados al modo convencional presentan, respecto al uso de células de MO o SP de un donante voluntario no familiar, las desventajas de: ^{30,31}

- 1.-Riesgos de reconstitución hematopoyética más tardía y de mayor tasa de fallos de prendimiento respecto a los trasplantes de MO o SP, que son relacionados con el número relativamente bajo de progenitores hematopoyéticos que se infunden (10 veces menor que en los trasplantes de MO o de SP) y al predominio entre los mismos de células de características primitivas, con menor proporción de progenitores más tardíos.

2.-Toxicidad de los tratamientos acondicionantes sobre mucosas y otros órganos y tejidos distintos del sistema hematopoyético, cuya recuperación puede verse dificultada por la tardía recuperación de granulocitos y plaquetas.

3.- Altos requerimientos trasfusionales y prolongado tiempo de hospitalización, como consecuencia de las peculiaridades anteriores, con las consecuentes repercusiones sobre costos económicos.

4.- Persistente deficiencia de la inmunidad celular protectora frente a agentes patógenos, relacionada con la baja cuantía de los progenitores pre-tímicos que se infunden y con el carácter “naïve” de los linfocitos T (post-tímicos) del recién nacido (el donante) (*vide infra*).

5.-Imposibilidad de recurrir al donante para actuaciones posteriores: re-transplante e infusiones de linfocitos.

4.- Posibilidades de mejora de la reconstitución hematopoyética tras los TSCU

Para tratar de superar estas limitaciones, fundamentalmente las relacionadas con la tardía reconstitución hematopoyética y altas tasas de fallos de prendimiento y MRT precoz, distintos grupos tratan de desarrollar estrategias innovadoras que puedan permitir mejorar los resultados finales del TSCU. Estas incluyen:

1.-Uso de tratamientos de acondicionamiento de intensidad reducida o submieloablativos,³²⁻³⁸

2.-Expansión “ex vivo” de los progenitores hematopoyéticos de la SCU,³⁹⁻⁴⁸ y ⁴⁹⁻⁵¹

3.-Manipulación de la expresión de moléculas de adhesión o anidamiento,^{29,52-54}

4.-Infusión vía intra-medular o intraósea,^{55,56}

5.-Co-infusión de dos o más unidades de SCU (multi-trasplantes),^{57,58}

6.-Co-infusión de células auxiliares obtenidas de un HLA no-compatible, como pueden ser progenitores de sangre periférica (CD34+ y CD133+), células mesenquimales (MSC), células T reguladoras (T-reg), células NK o células dendríticas, que puedan favorecer el prendimiento y/o la reconstitución de la inmunidad protectora o efectos inmunoterápicos antitumorales o contra patógenos.^{59,60}

Los acondicionamientos de intensidad reducida (TSCU-IR) se orientan a reducir la toxicidad extramedular que puede ser causa de morbi-mortalidad, tanto por efectos directos como por favorecer la EICH. Con los que son submieloablativos se trata, además, de retrasar la anulación de la hematopoyesis autóloga y permitir la reconstitución de la misma, que se espera sea transitoria, con el objetivo de acortar el tiempo de neutropenia y de dependencia transfusional, a riesgo de reducir el efecto antitumoral en el caso e indicación del trasplante para el tratamiento de enfermedades de esta naturaleza.

Son varios los estudios que se han publicado utilizando distintos regímenes de acondicionamiento de “intensidad reducida” con intención submieloablativa o de minimizar la toxicidad extra-hematológica. Los resultados en cuanto a tiempo de neutropenia post-trasplante son muy variables.

Inicialmente Wagner y col. (año 2003) obtuvieron prendimiento de granulocitos en la mayoría de un grupo de pacientes con una mediana de edad de 43 años (22-65) tratados con TSCU-IR (de 0-2 diferencias HLA) por LMA, SMD, LMC, LLA, EH y LNH utilizando regímenes de IR como: Bus-Flu-ICT (Bus 8mg/Kg, Flu 200mg/m², ICT 200cGy) y CTX-Flu-TBI (CTX 50 mg/Kg, Flu 200mg/m², ICT 200cGy.). Los tiempos para alcanzar el prendimiento de neutrófilos fueron de 12-30 días (mediana de 26), para los acondicionados con Bus-Flu-TBI y de 5-28 días (mediana de 9,5) para los que lo fueron con CTX-Flu-ICT. En ambos grupos se registró una baja incidencia de EICH aguda grave (9%), siendo la supervivencia al año del 39%.³⁴ Por otra parte, Del Toro y col. publicaron en 2004 resultados de trasplantes con acondicionamiento de IR en niños con una mediana de edad de 13 años (0.5-21): comparando TSCU no familiares en 14 pacientes, TMO familiar en 2 y trasplante de progenitores hematopoyéticos movilizados (PHM) de donante no familiar en 4 y TMO+PHM en 1. Se registró fallo de injerto en 5/21 pacientes (24%).³⁷ En otro estudio publicado por Chao y col. se obtuvo en un grupo de 13 adultos con patologías hematológicas malignas y sometidos a TSCU-IR, una supervivencia global del 77% (con mediana de 288 días) y SLE del 69% a los 100 días; la MRT fue baja: sólo un paciente muy tratado falleció por fracaso multiorgánico.³⁸

El grupo de la *Universidad de Minnesota* publicó en el año 2006 un nuevo estudio de TPH con acondicionamientos de IR en 21 adultos con LH en estadio avanzado, de los

que 9 recibieron TSCU no relacionado y 12 TMO HLA idéntico. La recuperación de neutrófilos fue más temprana en el grupo de TMO con medianas de 7 días vs 10 días), alcanzando todos los pacientes QC hacia el día +60. La incidencia acumulativa de desarrollo de EICH aguda fue igual en ambos grupos (33% vs 33%; $p=0,99$) pero sin embargo, la incidencia de EICH crónica fue menor en el grupo con TSCU. La MRT fue comparable en ambos grupos (11% vs 17%; $p=0,80$) y la SLE a los dos años del 25% para TSCU y 20% para TMO.³³

También en el 2006 el grupo del *Hospital Toranomon* publicó resultados de TSCU-IR en 20 adultos con mediana de edad de 46,5 años (27-66) afectos de linfoma maligno en estadios avanzados y utilizando una mediana de CNT infundidas de $2,75 \times 10^7/\text{Kg}$ (2,3-3,4). Se obtuvo prendimiento de granulocitos en 15/20 con una mediana de 20 días. En 8 se desarrolló EICH aguda grados II a IV y en 2 EICH crónica, obteniéndose RC en 10 con posterior recidiva en 1. Hubo 8/20 fallecimientos dentro de los primeros 100 días por causas relacionadas con el trasplante (MRT) siendo la SLE al año del 50%.³⁵ Recientemente (año 2007) el grupo del *Hospital Memorial Tsukuba* ha publicado resultados de TSCU-IR en 13 pacientes, con obtención de prendimiento en 9 con mediana de 18 días (rango 17-28), lográndose QCC en 6.³² Alta tasa de fallos de injerto tras TSCU-IR ha sido también descrita por otro grupo japonés.³⁶

Como resumen puede decirse que en los TSCU-IR el tiempo de neutropenia observado ha sido variable, la incidencia de EICH baja y que conllevan riesgo relativamente alto de fallos de prendimiento y de recidiva.

La expansión “ex vivo” de los PH de la SCU es una estrategia a primera vista atractiva, porque se ha comprobado que en los trasplantes con PH de MO o SP hay una relación entre el tiempo de recuperación de granulocitos y plaquetas y la cuantía de células CD34+ infundidas, con rangos de 8-9 y de 10-12 días, respectivamente, para dosis de

menos y más de 5×10^6 CD34+/Kg. Sin embargo, aunque con distintos métodos de cultivo (utilizando diferentes cócteles de citoquinas, con adición de quelantes de cobre como inhibidor de la diferenciación, sin y con estroma de células adherentes) pueden conseguirse considerables grados de expansión de células con características de PH y con potencial para la reconstitución hematopoyética en ratones SCID/NOD (expansión de las llamadas “SCID/NOD Repopulating Cells” SRC), hasta el momento no se han logrado resultados demostrativos de una capacidad de acortamiento del tiempo y probabilidad de prendimiento en los ensayos clínicos realizados infundiendo una parte de la unidad de SCU inmediatamente tras su descongelación y otra tras su cultivo previo.^{42,49-51} Además, datos experimentales y clínicos sugieren que las células cultivadas pueden perder su capacidad de anidamiento o de proliferación expansiva tras el trasplante, de modo que es verosímil que el prendimiento de estas células cultivadas, en los experimentos realizados, puedan provenir realmente de células progenitoras que han podido permanecer en fase G0 durante el tiempo de cultivo, lo que implicaría que con el cultivo de una fracción de la unidad de SCU lo que se hace es perder las células con capacidad de prendimiento sostenido.³⁹⁻⁴⁸

Las estrategias dirigidas a la manipulación de la expresión de moléculas de adhesión o anidamiento tampoco han encontrado hasta el momento utilidad en la clínica.⁵²⁻⁵⁴

Estudios clínicos sistemáticos de los trasplantes con dos unidades de SCU fueron iniciados, tras antecedentes de autores chinos, por el grupo de la *Universidad de Minnesota*. Utilizando acondicionamiento mieloablativo, este grupo ha observado altas tasas de prendimiento y baja frecuencia de fallo del injerto, pero exclusivamente de una de las dos unidades y sin acortamiento significativo del tiempo de neutropenia post-trasplante. Con el empleo concomitante de acondicionamiento submieloablativo se han conseguido, en pacientes de mal estado general o de edad avanzada, baja incidencia de complicaciones tóxicas y recuperación precoz de la neutropenia en una parte de los

pacientes y más tardío en el resto, alcanzándose prendimiento sostenido con quimerismo completo en más del 90% de los pacientes al día +100 (en una parte de los mismos tras una fase de quimerismo mixto) con un 4% de muertes precoces y 12% de fallos de injerto. No resulta sencillo entender el mecanismo del beneficio de tasas de prendimiento y supervivencia alcanzados, no habiéndose reconocido de forma concluyente factores predictivos de cual pueda ser la unidad que alcanza el prendimiento. El grupo del *Hospital General de Massachussets y Dana Farber Cancer Institute* observaron en 15 pacientes trasplantados con dos unidades de SCU y tratamiento submieloablatoivo, quimerismo dominante de una de las unidades en el 79% de los casos, que en un 85% correspondió a la primera unidad infundida, lo que llevó a la hipótesis de una posible saturación de los nichos hematopoyéticos, pero en dicho estudio las infusiones fueron hechas con 24 o más horas de intervalo. Recientes hipótesis tratan de relacionar estos aspectos del trasplante con dos unidades como efectos dependientes de interacciones de las células NK.^{57,58 y 6}

La inoculación intraósea se ha concebido como una estrategia que podría facilitar el prendimiento, al llevar las células directamente al microambiente hematopoyético soslayando el filtro pulmonar donde puede haber atrapamiento y posible eliminación de los progenitores administrados por vía intravenosa. El grupo de la *Universidad de Génova* ha descrito, en recientes comunicaciones orales, efectos favorables no sólo sobre el prendimiento sino también, sobre la incidencia de la EICH, lo que se ha intentado explicar mediante la hipótesis de inmediato contacto de las células infundidas con las células mesenquimales del estroma medular.⁵⁵ Sin embargo, estos datos no parecen haberse podido confirmar por Wagner en las comunicaciones presentadas en Los Ángeles, Roma y Madrid en el 2007 ya que en trasplantes, con dos unidades, una administrada por vía intraósea y otra por vía intravenosa, no se ha observado que la unidad administrada por vía intraósea sea la de implante predominante con mayor frecuencia, y no habiendo observado tampoco menor incidencia de EICH por la infusión intraósea, si bien es de señalar que sus pacientes no recibieron globulina anti-timocito, a diferencia de los pacientes tratados por el grupo de Génova.⁵⁶

La estrategia de “trasplante dual” de una unidad de SCU y un número relativamente bajo de células CD34+/CD133+ de SP altamente purificadas, de donante adulto HLA no idéntico, familiar o no familiar tras un tratamiento mieloablativo de baja toxicidad extrahematológica ha sido desarrollada por el grupo del *Hospital Universitario Puerta de Hierro de la Universidad Autónoma* de Madrid,⁵⁹ lo que constituye la base fundamental de este trabajo de tesis. Esta estrategia tiene como resultado de interés práctico una rápida recuperación de la neutropenia post-trasplante, de considerable efecto favorable sobre el desarrollo de infecciones relacionadas con la neutropenia y sobre la morbi-mortalidad precoz del post-trasplante. Los pormenores de la metodología desarrollada se describen en los apartados de Materiales y Métodos y Resultados de este trabajo.^{59,60}

5.- Reconstitución del sistema inmune tras el TSCU.

De la reconstitución inmunológica tras el trasplante, depende la posibilidad de desarrollo de EICH, aguda y/o crónica, que puede ser un importante factor determinante de morbi-mortalidad por los efectos de:

- a) daño directo del sistema inmune implantado sobre órganos y tejidos del receptor;
- b) facilitación de infecciones por las lesiones mucosas que rompen barreras; y
- c) inducción de inmunosupresión por el proceso de EICH y su tratamiento

Por otra parte, de la reconstitución inmunológica depende también, el desarrollo de mecanismos inmunoterapéuticos potencialmente eficaces frente a procesos tumorales (EICT), que es un importante elemento de la eficacia del TPH cuando el mismo tiene como indicación el tratamiento de este tipo de patología, así como la capacidad de defensa frente a agentes microbianos patógenos.

Para poder actuar sobre la reconstitución inmunológica tras el TSCU, de modo que pueda conseguirse mejorar la capacidad inmune frente a patógenos y el EICT sin

aumentar el riesgo de EICH, se precisa de un mejor conocimiento de la dinámica de la reconstitución del sistema inmune tras el TPH en general y el TSCU en particular.

El desarrollo ontogénico normal de la inmunidad se produce a partir de progenitores pre-tímicos de origen medular que colonizan el timo, donde experimentan un proceso de diferenciación, eliminación y selección bajo la influencia del componente epitelial del timo (Fig.2a y 2b). El resultado de este proceso es la generación de células T “naïve” de las que se generan las células efectoras y memoria (Fig. 3).

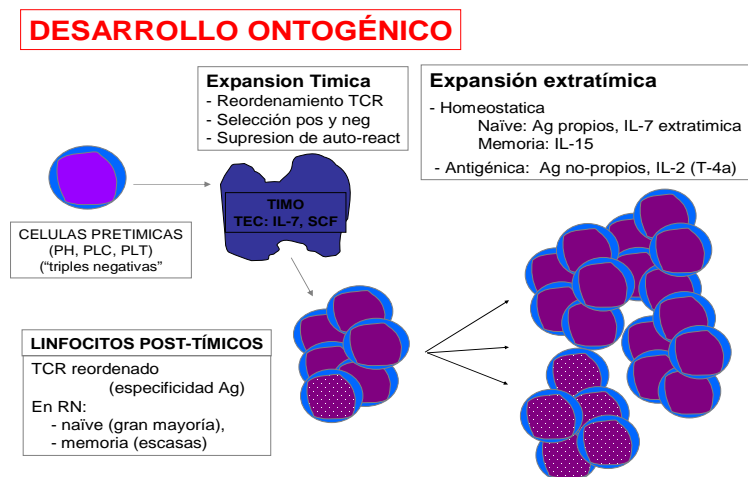


Figura 2a.- Desarrollo ontogénico de Linfocitos T

El desarrollo ontogénico de los linfocitos se produce a partir de células pretímicas definibles como Progenitores Hematopoyéticos (PH), Células Progenitoras de Linfocitos (PLC) y Células Progenitoras de Linfocitos Tímicos (PLT), que colonizan en timo embrionario. El proceso de selección linfocitaria se produce en el timo mediante eliminación y supresión de linfocitos auto-reactivos bajo las influencias de las células epiteliales del timo (TEC), y factores como IL7 y SCF. De este proceso resultan linfocitos T post-tímicos (con reordenamiento del TCR determinante de especificidad antigénica), que son claramente detectables entre la población linfocitaria del feto a partir del tercer-cuarto mes con características inmunofenotípicas similares a las que presentan en el momento del nacimiento, siendo mayoritariamente del inmunofenotipo naïve. Los linfocitos posttímicos naïve pueden experimentar expansión homeostática en presencia de antígenos propios bajo el efecto de la IL7 extratímica. Por exposición a antígenos no propios y bajo efecto de IL2 pueden adquirir inmunofenotipo de células efectoras y memoria, que también pueden resultar expandidas

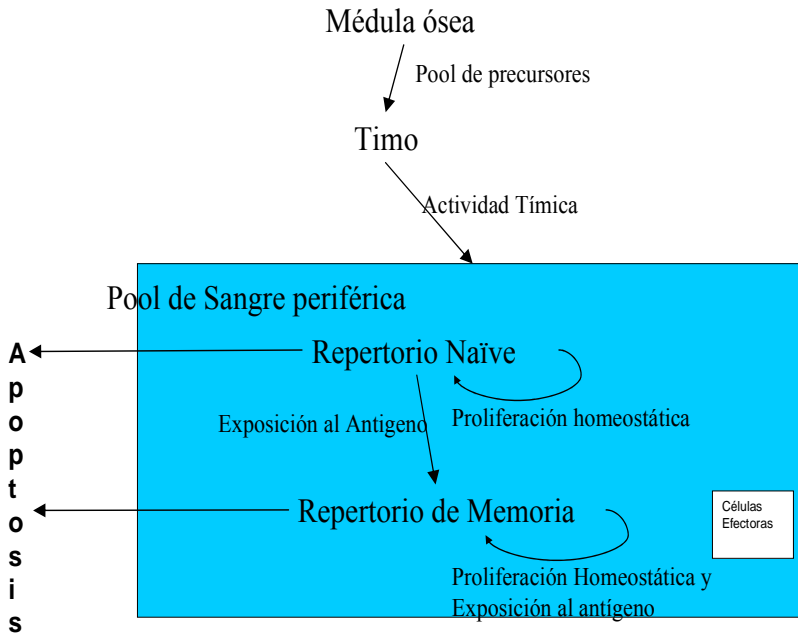
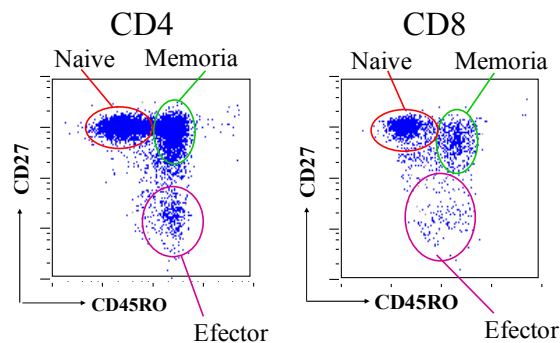


Figura 2b.- Homeostasis de los Linfocitos T.

Los linfocitos T proceden de la célula primitiva linfoide, ubicados en la médula ósea. Estos cuando llegan al timo son células inmaduras, sufren un proceso de maduración que tiene como objeto la eliminación, por apoptosis, de los clones de timocitos que hayan generado un receptor del linfocito T hacia el antígeno (TCR, de T cell receptor) con especificidad hacia un Ag propio (selección negativa) y por otro lado, al salir de este órgano ya se han transformado en linfocitos Th (helper) y linfocitos Tc (citotóxicos) inmunocompetentes pero inactivados (clones de células T maduras vírgenes). Posteriormente abandonan el timo y pasan a la sangre periférica y a los órganos linfoides secundarios, transformándose en linfocitos maduros.

Figura 3.- Distribución de las poblaciones naíve, memoria y efector: en citometría de flujo.

Mediante marcaje para CD27 y CD45RO pueden distinguirse, tanto en la población de células cooperadoras (CD4) como en las citotóxicas (CD8), células naíve (CD45RO neg., CD27 pos) de las memoria (CD45RO pos, CD27 pos) y de las efectoras (CD45RO pos, CD27 neg.). Pueden encontrarse también células CD45RO neg., CD27 neg. que se identifican como efectoras terminales.



Varios son los posibles factores concurrentes, aparte de la administración de medicación inmunosupresora, que hacen que la recuperación de la capacidad inmunológica tras el TSCU se produzca de forma tardía. Entre dichos factores pueden estar el propio carácter “naïve” de los linfocitos T (post-tímicos) de la SCU que son infundidos, el bajo número de progenitores pre-tímicos presentes en la SCU trasplantada y la deficiente función tímica en el paciente receptor del TSCU (por razón de edad, patología o previos tratamientos radio-quimioterápicos) (Fig. 4).

La lenta reconstitución de la inmunidad protectora es determinante del riesgo prolongado de desarrollo de complicaciones infecciosas graves por agentes oportunistas, que son un importante factor persistente de morbi-mortalidad en los pacientes sometidos a TSCU que alcanzan a superar los riesgos inherentes al retraso o el fallo de la reconstitución hematopoyética (prendimiento). Pero aparte del alto riesgo de infecciones oportunistas, la tardía reconstitución de la inmunidad tras el TSCU contribuye también a que sea relativamente bajo el riesgo de EICH, especialmente la EICH aguda, dependiente en gran medida de la capacidad de alo-reactividad de los linfocitos contenidos en el producto de trasplante, sin que este relativo bajo riesgo de EICH y baja capacidad de reacción frente a patógenos se acompañe, a tenor de los datos clínicos disponibles, de menor EICT del TSCU respecto a otros TPH.

En los últimos años se han publicado diferentes estudios sobre la reconstitución del sistema inmune en receptores de TSCU, cuyos datos son demostrativos que, en la fase temprana post-trasplante, en el ambiente linfopénico del receptor, se produce una expansión “homeopática” in vivo de los linfocitos del donante infundidos con el injerto (fase timo-independiente) a lo que sigue, la generación tímica de linfocitos “naïve” a partir de la diferenciación, en el microambiente tímico o en otras posibles localizaciones no identificadas, de las células madre hematopoyéticas del donante (células pre-tímicas) que posteriormente continuaran su desarrollo en órganos linfoides periféricos, siguiendo su desarrollo una cinética comparable al desarrollo que las mismas siguen en el neonato (Fig. 4).

En el año 2.000, Thomson publicó un estudio en 27 niños receptores de TSCU no relacionado, en el que describió una recuperación de células NK a los 2 meses, de linfocitos B a los 6 meses, de T CD8+ a los 9 meses y de T CD4+ a los 12 meses, concluyendo que la recuperación de las poblaciones linfocitarias tras el TSCU es semejante a la que ocurre tras trasplantes de otros donantes.⁶¹

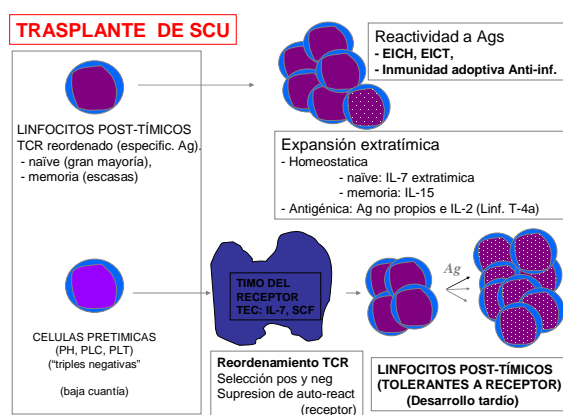


Figura 4.-Desarrollo de linfocitos T tras el TSCU

Tras el TSCU, el desarrollo de los linfocitos T se produce por un doble mecanismo. Por una parte puede haber expansión de los linfocitos T post-tímicos infundidos con el trasplante, en su mayoría de inmunofenotipo naive y sólo una pequeña proporción de inmunofenotipo memoria, como expansión homeostática en el ambiente linfopénico del receptor (bajo influencia de IL15 y de IL7 extratímica) y como respuesta a la estimulación de antígenos no propios bajo influencia de IL2. De esta expansión pueden resultar EICH, EICT y reactividad protectora frente a patógenos. Por otra parte y como fenómeno más tardío y con una cinética equiparable al desarrollo ontogénico normal de linfocitos T, pueden producirse linfocitos T de nueva generación en el timo del receptor o (posiblemente) en territorios extratímicos. Estos linfocitos serían tolerantes al receptor y tendrían capacidad de reacción antitumoral y frente a patógenos.

En otro estudio en 63 pacientes pediátricos del grupo *Eurocord*, con mediana de edad de 4 años, que recibieron TSCU (14 familiares, 49 no familiares) y con una mediana de CNT de $6,1 \times 10^7/\text{kg}$, se obtuvieron resultados similares, con tiempos de recuperación de 3 meses para las células NK, de 6 meses para los linfocitos B, 9 meses para los CD8+ y un año los CD4+. ⁶² Como factores favorecedores de la recuperación se identificaron: donante familiar, mayor número de CNT y receptor CMV positivo, y el desarrollo de EICH como factor retardador de la recuperación de las células T.

En un estudio sobre la recuperación de las células T tras TSCU mediante la medida de los *sjTRECs*, Klein describió la consecución de valores normales al año del trasplante en pacientes pediátricos y que en adultos no empiezan a ser detectados, hasta los 18 meses, permaneciendo siempre más bajos de lo esperable por la edad.⁶³

Por otra parte, Moretta realizó un estudio comparativo de la reconstitución inmune en dos grupos de 23 pacientes, uno constituido por receptores de TSCU y el otro por receptores de TMO de donante familiar, encontrado similares números absolutos de células NK, CD4+ y CD8+ en ambos grupos y más altos de linfocitos B y de células T CD4+ en los receptores de TSCU.⁶⁴ Según Weinberg, uno de los factores que afecta negativamente a los niveles de los *TRECs* tras el trasplante de células hematopoyéticas, es el desarrollo de la EICH crónica.⁶⁵

HIPÓTESIS

HIPOTESIS

El trabajo de investigación de la *Unidad de Trasplante Hematopoyético del Hospital Universitario Puerta de Hierro* en el campo del TSCU está sustentado en la hipótesis de que los resultados del TSCU para el tratamiento de procesos oncohematológicos en adultos, podrían mejorarse mediante ajustes en el tratamiento acondicionante y el uso de células auxiliares obtenidas de donantes adultos. Estas podrían proporcionar soporte para la reconstitución hematopoyética, así como efectos moduladores sobre el desarrollo del sistema inmune, que pudieran traducirse en potenciación de la reconstitución de la inmunidad protectora sin aumentar el riesgo de EICH.

Esta hipótesis general está fundamentada en:

- 1) Los resultados obtenidos por varios grupos en TPH de células de sangre periférica de donantes haploidénticos.⁶⁶
- 2) Los resultados de experimentos de “trasplante dual” (de células de SCU y de progenitores hematopoyéticos movilizados, altamente purificados, obtenidos de donante adulto), tanto en el modelo SCID/NOD como en ensayos clínicos previos.⁵⁹
⁶⁷
- 3) Los resultados inicialmente descritos sobre efecto inmunomodulador de la co-infusión de células mesenquimales expandidas (MSC) en pacientes receptores de TMO no familiar, así como los resultados descritos en estudios preclínicos relativos al efecto de la co-infusión de otras poblaciones celulares.⁶⁸⁻⁷⁰
- 4) Datos del efecto inmunomodulador que pueden ejercer los linfocitos T-regs. (CD4+ CD25+),⁷¹⁻⁷⁶
- 5) Datos del efecto antitumoral que puede ser ejercido por células NK y linfocitos T alo-reactivos⁷⁷⁻⁷⁹

Trabajos de I+D desarrollados conforme a estas hipótesis han sido la base de las contribuciones del grupo del Servicio de Hematología del *Hospital Universitario Puerta de Hierro* a los Proyectos Europeos de Investigación cooperativa *Eurocord* y *AlloStem*.

Dentro de esta hipótesis general, las hipótesis del trabajo planteadas por el equipo del Servicio de Hematología del *Hospital Universitario Puerta de Hierro* han sido las siguientes:

- a) Mediante las modificaciones de los tratamientos acondicionantes orientadas a reducir la toxicidad extrahematológica, manteniendo intenso efecto antitumoral y mieloablativo así como, potente efecto inmunosupresor para evitar rechazo, se podría contribuir a reducir la mortalidad precoz relacionada con el procedimiento. Su efecto favorable sería por reducción del riesgo de daño tóxico sobre diferentes órganos (fundamentalmente mucosas, pulmón e hígado) con disminución del riesgo de infecciones precoces como consecuencia de mejor preservación de la integridad de las mucosas y del factor de riesgo de EICH que supone el daño de mucosas y otros tejidos.
- b) Mediante la co-infusión de PHM de un donante HLA-incompatible (“donante auxiliar”), altamente depleccionados de linfocitos T, podría ser posible conseguir un prendimiento precoz con reducción del tiempo de citopenias post-trasplante y de los riesgos inherentes al mismo, sin riesgo de producir EICH ni rechazo del TSCU, al no tener las células del donante auxiliar infundidas capacidad para desarrollar un sistema inmune, al menos a corto plazo. El eventual implante mieloide podría ser persistente sin riesgo de efectos desfavorables o ser eventualmente reemplazado, o rechazado, por el prendimiento del TSCU.
- c) La co-infusión de otras poblaciones celulares de “donante auxiliar” podría tener efectos sobre el desarrollo del sistema inmune a partir del TSCU, con la posibilidad de modular favorablemente el balance entre reconstitución de inmunidad protectora (anti-patógenos y antitumoral) por un lado, y EICH por otro. Las poblaciones candidatas a ejercer estos efectos podrían ser, aparte de los PH, las células estromales multipotenciales (células mesenquimales o MSC), las células T reguladoras o las células NK.
- d) Para valorar estos posibles efectos reguladores en los pacientes receptores de TSCU se precisa de una valoración precisa de la cinética de desarrollo del sistema inmune

en los pacientes sujetos de estudio, tanto en lo que respecta al desarrollo de poblaciones celulares, como al de su funcionalidad.

- e) La elaboración de protocolos para el eventual uso clínico precisa de conocimientos derivados de estudios preclínicos en modelos animales de características apropiadas.
- f) Para la obtención de poblaciones celulares que puedan ser utilizadas como células auxiliares en la práctica clínica, pueden ser necesarios, aparte de procedimientos de selección celular, procedimientos para su expansión ex vivo, todos ellos de grado clínico; cuya realización puede hacer necesaria la disponibilidad de instalaciones laborales “GMP” (buena práctica manufacturera).

Todas estas cuestiones son objeto de desarrollo y evaluación como parte del programa de I+D+i que se viene desarrollando por el equipo del Servicio de Hematología del *Hospital Universitario Puerta de Hierro*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL ESTUDIO DE ESTA TESIS

Los trabajos que, dentro del plan general de Investigación, Desarrollo e Innovación del Servicio de Hematología del *Hospital Universitario Puerta de Hierro* en el campo del TSCU, forman parte de esta Tesis Doctoral, por ser los trabajos directamente realizados por la doctorando, son los que han tenido como objetivos inmediatos:

- 1) Investigar las posibilidades de acortar el tiempo de citopenias post-trasplante mediante la co-infusión de progenitores hematopoyéticos movilizados obtenidos de donante auxiliar HLA incompatible,
- 2) Investigar la cinética de la reconstitución del sistema inmune en los pacientes sometidos a TSCU con la referida estrategia.

No se incluyen trabajos relativos a la obtención y uso clínico de células de donante auxiliar, células seleccionados como células CD34+ y/o CD133+, ni a ensayos preclínicos en modelos animales que también se llevan a cabo por el grupo referido como parte de su plan general de I+D+i en el campo del TSCU.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Pacientes

Se consideraron elegibles para la inclusión en el presente estudio todos los pacientes adultos tratados en el *Hospital Universitario Puerta de Hierro*, de la Universidad Autónoma de Madrid, entre Marzo-1999 y Diciembre-2006, que por razón de proceso neoplásico de naturaleza hematológica, fueran subsidiarios de TPH y carecieran de donante familiar y en los que se daba la posibilidad de TSCU alogénico utilizando la metodología que hemos venido en denominar de “trasplante dual”, consistente en la co-infusión de una unidad de SCU y de progenitores hematopoyéticos altamente purificados obtenidos de un donante auxiliar.

2.-Procedimientos de tipaje HLA

El tipaje HLA de pacientes, donantes auxiliares y unidades de SCU se ha realizado a nivel antigénico, mediante procedimientos serológicos, para los loci de Clase I y a nivel alélico, por procedimientos moleculares de alta resolución, para los loci Clase II.

3.-Búsqueda y selección de las unidades de SCU.

Las Unidades de SCU utilizadas fueron en todos los casos obtenidas de Bancos de la red internacional acreditados según los “Standard FACT/Netcord” mediante la gestión del REDMO (Registro Español de Donantes de Médula Ósea), generalmente tras consulta preliminar, a través de Internet, de las bases de datos de NETCORD (<http://www.netcord.org>) y de de BMDW (<http://www.bmdw.org>) para estimar de cada caso las posibilidades de obtener una unidad adecuada en momento apropiado, al objeto de adecuar el tratamiento previo del paciente a la posibilidad de la realizar un TSCU.

La selección de las unidades se realizó sobre la base de los criterios primordiales de:

- 1) Compatibilidad HLA, requiriéndose un mínimo de 3 identidades HLA en loci clase I A y B (a nivel antigénico) y clase II DRB1 (a nivel alélico).

- 2) Número de CNT, determinado previamente a la congelación, requiriendo un mínimo de $1,25 \times 10^7$ por Kg de peso del paciente receptor.
- 3) Número de células CD34+, también determinado antes de la congelación, requiriéndose un mínimo de $0,05 \times 10^6$ por Kg de peso del paciente receptor (cuando estaba disponible).

Como criterios secundarios de selección se utilizaron la criopreservación tras concentración con reducción del contenido eritrocitario, datos de tipaje en otros loci HLA y datos de contenidos de células formadoras de colonias (CFU) cuando estaban disponibles, la compatibilidad ABO y la identidad del Banco, dándose preferencia a los europeos, por su mayor facilidad de transporte.

El proceso de selección ha incluido en muchos casos, el intercambio de muestras entre el Centro de trasplante y los Bancos de Sangre, al objeto de constatar los datos de compatibilidad antes de decidir la elección de la unidad.

A similar grado de compatibilidad HLA se ha dado preferencia, a las unidades de más alto contenido en CNT y CD34+. En los casos en los que ha habido que decidir entre unidades con 0 y 1 ó entre unidades con 1 y 2 disparidades se ha preferido la de menor grado de compatibilidad en caso de tener un “sustancial” mayor contenido celular en términos de CNT y, especialmente, de células CD34+.

El traslado de las unidades de SCU del Banco de procedencia al Centro de trasplante se ha hecho de acuerdo con las normas NETCORD, en contenedores de nitrógeno líquido con controles de las condiciones térmicas durante el traslado.

4.-Procesamiento de las Unidades de SCU e infusión

Las unidades han sido descongeladas inmediatamente antes de su infusión en un baño de agua a 37° C. En caso de incompatibilidad ABO o alto contenido de hematíes, se ha utilizado el protocolo del Banco de Nueva York para lavado, al objeto de retirar la mayor parte del crioprotector (DMSO) y los productos de lisis celular ⁸⁰. En otras situaciones, como son las de trasplante de unidades concentradas a pacientes adultos se

ha hecho solamente dilución de la unidad con igual volumen (relación V/V de 1/1) (con dextrano 40 al 10% / solución de suero salino al 5% de albúmina humana), sin realizar lavados, a fin de minimizar la pérdida de células. De la suspensión celular final se reserva una muestra para los conteos de células nucleadas, CD34+, CFU-GM y controles microbiológicos.

Tras la descongelación las células se han transportado rápidamente a la cabecera del enfermo y se han infundido a través de un catéter venoso central, habiéndose premedicado al paciente con corticoides y antihistamínicos según pautas habituales. La infusión se realiza con un intervalo mínimo de un día (24 horas) desde la terminación de la administración de los agentes citotóxicos del acondicionamiento cuya fecha se ha considerado como “día 0”.

5.-Células auxiliares de donante voluntario y selección del donante.

Como células auxiliares se han utilizado PHM obtenidos de un donante voluntario (“donante auxiliar”) por procedimientos habituales de leuco-aféresis y selección positiva como células CD34+ o CD133+.

Como donante se ha dado preferencia a los familiares inmediatos HLA haploidénticos, preferentemente hermanos. A falta de hermano haploidéntico se han utilizado otros familiares como padres, hijos u otros haploidénticos, si bien tras experiencias iniciales desfavorables con la utilización de madres, éstas han sido evitadas como posibles donantes. En aquellos casos sin disponibilidad de donante haploidéntico se han empleado donantes sin haplotipo HLA compartido, familiar o no relacionado.

En todo caso el/la donante ha debido reunir los requisitos exigibles para la donación de sangre y no presentar ninguna circunstancia que pudiese contraindicar la administración de tratamiento de movilización firmando el correspondiente consentimiento informado. Siempre que fuese posible se ha preferido un donante sin incompatibilidad ABO mayor, debiendo en todo caso ser negativa la prueba cruzada de citotoxicidad. Para pacientes CMV negativos se ha requerido que el donante auxiliar fuera también seronegativo para este agente.

6.-Procesamiento de los PHM e infusión.

Para la obtención de los PHM, los donantes han recibido tratamiento movilizante con factor de crecimiento granulocitario (G-CSF) en la dosis y pautas convencionales (10ug/Kg/24h) durante 4 días, realizándose aféresis al 5º día y, de resultar necesario, una segunda al 6º. El producto de aféresis se ha sometido a procedimiento de selección positiva de los PHM como células CD34+ o CD133+, utilizando los métodos inmunomagnéticos comercializados por *Miltenyi*, siendo el objetivo obtener una fracción que supusiera para el receptor entre $2-3 \times 10^6$ /Kg de PHM con menos de 10^4 /Kg de células CD3+. El producto final ha sido objeto de congelación utilizando técnicas convencionales, conservándose en nitrógeno líquido hasta el momento del trasplante, momento en que han sido descongeladas de acuerdo con procedimientos convencionales e inmediatamente infundidas al paciente con un intervalo de 4-24 h tras la infusión de la SCU.

7.-Controles de productos de trasplante, SCU y PHM.

A todos los productos del trasplante, SCU y PHM del donante auxiliar, se realizan los controles habituales para valorar función hematopoyética, viabilidad y posibilidad de contaminación microbiana. Estos controles incluyen conteos de CNT, CD34+, CD133+, CD3+ y CFU, determinación de viabilidad celular por método de exclusión del Azul Tripán y cultivos para hongos y bacterias.

8.-Procedimiento del trasplante

8.1. Acondicionamiento de los pacientes receptores

El tratamiento de acondicionamiento (o “preparativo”) pre-trasplante se ha ajustado a la situación clínica del paciente y a los tratamientos recibidos previamente.

Se han utilizado los siguientes esquemas preparativos:

a) Irradiación corporal total (ICT) en dosis total de 1200 cGy fraccionada en 6 dosis parciales, administradas dos veces al día durante tres días (días -7 a -5), con protección pulmonar a 800 cGy, CTX i.v. en dosis total de 120 mg/Kg repartidos en dos días, (días -4 a -3), y globulina antitimocito humano de caballo, (Linfoglobulina[®] IMTIX-SANGSTAT, Barcelona, España) en dosis de 30 mg/Kg/día, administrada en los últimos tres días del acondicionamiento (días -3 a -1). Este esquema sólo se utilizó al comienzo del estudio en tres de los 46 pacientes.

b) En la mayoría de los pacientes (32 de 46) se utilizó un acondicionamiento con ICT en dosis reducida a 1000 cGy, administradas en cinco dosis, dos veces al día en tres días (-8 a -6) con protección pulmonar a 800 cGy, Flu i.v. en dosis total de 120 mg/m² repartido en 4 días (30mg/m²/día, día -5 a -2), CTX i.v. en dosis total de 120 mg/Kg repartido en dos días (días -4 y -3) y ATG administrada en los días -2 y -1, [Linfoglobulina[®] a 30 mg/Kg/día o de Thymoglobulina[®] (globulina antitimocito de conejo a 2 mg/Kg/día)]. En dos de estos pacientes no se utilizó ATG por el alto riesgo de recaída de su leucemia y/o problemas infecciosos previos al trasplante.

c) En nueve pacientes afectados de procesos mieloproliferativos o con contraindicación para el empleo de ICT, se utilizó el régimen consistente en Flu i.v. en dosis total de 120 mg/m² en 4 días (30 mg/m²/día, día -8 a día -5), Busulfán (Bus) vía oral, en dosis total de 8 mg/Kg/día durante 2 días (4 mg/Kg/día, días -6 a -5) o vía intravenosa a dosis 3.2 mg/Kg/día durante 2 días, CTX i.v. en dosis total de 120 mg/Kg/día en 2 días (60 mg/Kg/día -4 a -3) y ATG, (Linfoglobulina a 30 mg/Kg/día) o ATG (Thymoglobulina a 2 mg/Kg/día), los días -2 y -1.

d) En otros dos pacientes (uno de ellos con LNH B de células grandes en recaída y el otro con Linfoma Burkitt) el régimen utilizado fue Flu i.v. en dosis total de 120 mg/m² (30mg/m²/día) en los días -5 a -2, AraC i.v. en dosis de 2g/m² días -8 a -4, CTX i.v. dosis total de 120 mg/Kg/día (60 mg/Kg/día) en 2 días (días -3 y -2) y ATG (Thymoglobulina 2 mg/Kg/día), día -1.

8.2. Profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped.

Para la profilaxis frente a la EICH, los pacientes han recibido (además del ALG/ATG), Ciclosporina A (CsA) desde el día -5, inicialmente por vía i.v. en dosis de 1.5 mg/kg/12h, con los ajustes necesarios para lograr niveles plasmáticos entre 180-250ng/mL, pasándose a la administración por vía oral tan pronto como sea posible por la tolerancia digestiva. Su administración se ha mantenido hasta que se alcanza el quimerismo completo del TSCU. Además de la CsA, los pacientes han recibido Metilprednisolona i.v a una dosis de 1 mg/Kg/día desde el día -1 (día de inicio de ATG o ALG), con retirada, entre los días +7 y +14, tan pronto como es estimable clínicamente conveniente en cada caso.

8.3. Estimulación de prendimiento.

Como estímulo para el prendimiento, los pacientes han recibido G-CSF, (Filgrastim) en dosis de 30 MU/día desde el día +1 post-trasplante, mantenida hasta que se ha alcanzado un número absoluto de granulocitos neutrófilos circulantes (CAN) de $1 \times 10^9/L$. A partir de ese momento, la dosis se ha ajustado en la medida necesaria, para mantener el CAN por encima de este nivel.

La figura 5 muestra un esquema general del tratamiento acondicionante (el correspondiente al descrito en el párrafo b) de la página 31.

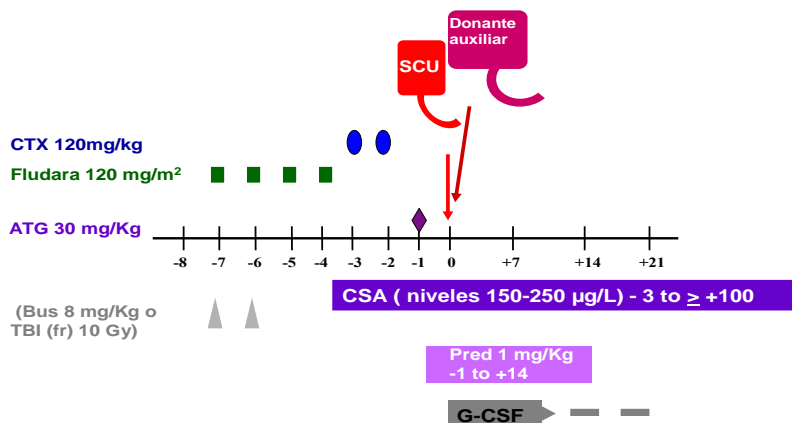


Figura 5.- Esquema general del procedimiento del “TSCU dual”, con co-infusión de progenitores hematopoyéticos de un donante auxiliar HLA diferente.

En el esquema se representa el régimen de acondicionamiento más frecuentemente utilizado: esquema b) de los descritos en material y métodos.

8.4. Tratamiento de soporte y otros tratamientos para diferentes eventos.

Los pacientes han sido atendidos en habitaciones individuales con aire filtrado y presión positiva. Como profilaxis de urotoxicidad vesical por CTX se utilizó la administración de Mesna e hiperhidratación. Para la descontaminación bacteriana y la profilaxis de infecciones se han utilizados las siguientes pautas de tratamiento:

- Profilaxis antifúngica: Fluconazol, 200 mg/24h i.v. o Itraconazol, 200mg i.v. desde el día +1 hasta la recuperación de granulocitos.
- Profilaxis antibacteriana: Inmunoglobulina inespecífica, 500 mg/Kg/semana i.v. desde el día -3 hasta el +60 y Ciprofloxacino 500 mg/12h vía oral desde el día -8 hasta alcanzar un CAN estable por encima del nivel $1 \times 10^9/L$.
- Profilaxis de la infección por *Pneumocystis Carinii*: Pentamidina inhalada, 300 mg/28 días hasta una vez que el prendimiento está bien establecido, cuando se ha sustituido por Clotrimoxazol (Septrim Forte®), 1 comprimido/12h, dos días/semana, que se ha continuado indefinidamente en todos los pacientes excepto en aquellos que reciben quimioprofilaxis para el Toxoplasma.
- Profilaxis antivírica: Aciclovir i.v., 500 mg/8h desde el día -8 hasta el +35, cuando se ha pasado a la administración oral en dosis de 800 mg/12h, continuándose hasta 1.5 años post-TSCU.
- Profilaxis de la infección por *Toxoplasma Goondi*: Desde el año 2004, todos los pacientes con serología positiva para toxoplasma por anticuerpos IgG y los pacientes seronegativos receptores de células de soporte de un donante auxiliar positivo, han recibido, desde un mes antes del trasplante, Trimetoprim-Sulfametoxazol, 1 tableta, 3 días por semana, con administración de antieméticos si preciso. En caso de mala tolerancia, se ha administrado la misma dosis por vía i.v. (1.5 ampollas). Después del TSCU los pacientes han recibido Azitromicina oral (en lugar del Trimetoprim-Sulfametoxazol) en dosis inicial de 1 gramo/ 2 veces por semana. Tras el prendimiento, los pacientes han recibido semanalmente Pirimetamina 25mg, Sulfadiazina (Fansidar^R) tabletas de 500 mg, una por cada 20Kg de peso (3 tabletas para un paciente de 60-70 Kg) y ácido fólico, 50 mg, continuándose este régimen hasta el día +180.⁸¹

Los pacientes han recibido, además, profilaxis vitamínica con Vitamina K (una ampolla dos veces por semana) y el soporte transfusional con concentrados de

hematíes y plaquetas en la medida necesaria para mantenerlos libres de síntomas por anemia o trombopenia o para reducir riesgos inherentes a las mismas. Todos los productos hemoterápicos han sido irradiados y desleucocitados.

Para profilaxis y tratamiento de emesis se han utilizado fármacos antieméticos habituales en la medida que en cada caso ha sido preciso.

En los casos en los que se ha utilizado acondicionamiento incluyendo Bus, los pacientes han recibido profilaxis anticonvulsivante con Fenitoína 300 mg/8h vía oral en las 24 horas antes de comenzar con la medicación, continuando con 100 mg/8h (que en caso de vómitos se ha administrado por vía i.v.), hasta 24 h después de la última dosis de Busulfán oral. En caso de producirse convulsiones, el tratamiento realizado ha sido conforme a las indicaciones de especialistas en neurología.

8.5. Monitorización de colonizaciones e infecciones

De los pacientes hospitalizados se han tomado semanalmente (Lunes y Jueves), de forma sistemática y rutinaria, muestras para cultivo de sangre del catéter central y de vena periférica, de orina y de esputo, así como análisis por PCR y determinaciones del antígeno del *CMV* y determinación del galactomanano en sangre para detección precoz de reactivaciones de infección por *CMV* y por *Aspergillus*.

9.-Evaluación del trasplante

9.1. Evaluación del prendimiento mieloide y plaquetario.

El *prendimiento granulocítico* se ha definido como CAN igual o superior a $0.5 \times 10^9/L$ durante 3 días consecutivos y el *prendimiento plaquetario* como una cifra de plaquetas superior a $20 \times 10^9/L$ durante 3 días consecutivos sin soporte transfusional. El nivel de $50 \times 10^9/L$ se ha utilizado como criterio de prendimiento plaquetario consolidado.

En función del CAN en sangre periférica y de la proporción de ADN de SCU (PCR cuantitativa) se ha calculado la cantidad de neutrófilos del cordón, habiéndose definido

el prendimiento del TSCU como la superación de $0.5 \times 10^9/L$ de CAN procedentes del TSCU.

9.2. Evaluación de la reconstitución del sistema inmune

Se ha realizado con arreglo al protocolo adoptado para el proyecto integrado AlloStem (6º Programa Marco de la CE), cuantificando distintas subpoblaciones linfocitarias y analizando la presencia de TRECs en los distintos momentos del curso del paciente.

El calendario de recolección de muestras utilizado se extiende desde el día -7 (muestra pre-trasplante) hasta los 2 años, con tomas en los intervalos de días: 14-20, 35-40, 55-60, 90-100 y, con posterioridad, con tomas mensuales hasta completar el año de seguimiento y luego a los 15, 18 y 24 meses post-trasplante. Las muestras se han recogido en tubos de EDTA y/o Heparina sódica (HS, 170 U.I.) como anticoagulantes.

La cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias se ha realizado sobre la base de la expresión de moléculas de superficie mediante análisis por inmunofluorometría de flujo utilizando métodos de inmunofluorescencia directa con cuatro colores (*Citómetro FC 500 Beckman Coulter*). Se utilizaron distintas combinaciones de anticuerpos monoclonales cuya relación se encuentra en la Tabla 1, conjugados con los siguientes fluorocromos: *Isotiocianato de fluoresceína (FITC)*, *Ficoeritrina (PE)*, *R Ficoeritrina-Texas Red^R-X (ECDTM)*, *R Ficoeritrina- Cianina 5.1 (PC5)*.

Los estudios de inmunofluorocitometría se han realizado sobre muestras de sangre completa anticoagulada con EDTA obtenidas en distintos momentos de la evolución de los pacientes (según cronograma más arriba descrito), utilizando 100uL de sangre para cada tubo de análisis, que han sido marcados con 2μL del anticuerpo monoclonal correspondiente; tras 15 minutos de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente (18-25°C) se ha añadido 1 mL de solución de lisis (Versalyse^R) mezclando inmediatamente durante un segundo. El componente activo de esta solución es una amina cíclica que, en contacto con la *anhidrasa carbónica* de los hematíes se transforma en un compuesto altamente lítico para dichas células sin afectar a los leucocitos, de tal forma que, tras una incubación durante al menos 10 minutos protegido de la luz, con agitación, se eliminan los eritrocitos de la muestra. Posteriormente se añaden 100μL de *Flow-CountTM Fluoroshers* (Beckman Coulter

Corp., Miami, FL, CA), procediéndose a continuación al análisis de las muestras con el citómetro de flujo antes de las 2 horas.

Tabla 1.- Anticuerpos monoclonales utilizados en análisis inmunofenotípico.

Especificidad ⁽¹⁾	Fluoróforo ⁽²⁾	Clon ⁽³⁾	Expresión ⁽⁴⁾	Proveedor ⁽⁵⁾
Control isotipo	FITC, PE o RD1, ECD, PC5		No se expresan en células humanas	BC
CD3	PC5	UCHT1	Linfocitos T	BC
CD4	RD1, ECD	SFC112T4D11	Linfocitos T cooperadores, algunos monocitos/macrófagos	BC
CD8	FITC, ECD	B9.11 / SFC121Thy2D3	Linfocitos T	BC
CD14	PE		Monocitos/macrófagos y granulocitos	BD
CD16	PE		Células NK, monocitos/macrófagos y granulocitos	BD
CD19	ECD	J4.119	Linfocitos B	BD
CD25	PE		Linfocitos T activados, linfocitos B, células NK	BD
CD27	FITC	M-T271	Timocitos y linfocitos T maduros	BD
CD45	FITC	2D1	Leucocitos	BD
CD45RA	PE	F8-11-13	Linfocitos B y linfocitos T	Serotec
CD45RO	PE	UCHL1	Linfocitos T memoria y/o activados	Serotec
CD56	RD1	N901/NKH-1	Células NK	BC

⁽¹⁾ Molécula de superficie que reconoce el Ac monoclonal

⁽²⁾ Fluoróforo con el que está conjugado el Ac monoclonal

⁽³⁾ Denominación del clon del que proceden los anticuerpos

⁽⁴⁾ Sólo se indican las células que se han valorado en este estudio

⁽⁵⁾ BD Biosciences; BC Beckman Coulter; Serotec (UK)

Las siguientes combinaciones son mezclas comercializadas de 4 anticuerpos monoclonales: CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 y CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 denominadas *tetraCHROME™* de BC.

Las diferentes combinaciones de anticuerpos utilizados permiten la identificación de las subpoblaciones en la sangre periférica como se muestran en la Tabla 2. Para

conocer el valor absoluto (células/ μ L) de las poblaciones de estudio de la muestra se utiliza el *Flow-CountTM Fluorospheres* que es un reactivo con una concentración conocida de microesferas fluorescentes. El principio se basa en la mezcla de un volumen conocido de sangre completa y la misma cantidad del reactivo, de tal forma que podemos conocer el valor absoluto de las células a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Valor absoluto (cls}/\mu\text{l)} = (\text{N}^{\circ} \text{ total de cls contadas} \times \text{Concentración de fluorosferas del Flowcount}) / \text{N}^{\circ} \text{ de fluorosferas contadas}$$

Tabla 2.-Subpoblaciones linfocitarias evaluadas. Marcadores utilizados para la caracterización de las diferentes subpoblaciones linfocitarias por inmunofluorocitometria de flujo utilizando los anticuerpos monoclonales que se especifican en la Tabla 1

• Células T	CD3+ CD19-CD45+
• T colaboradoras	CD3+/CD4+/CD45+/CD8-
Naïve	CD27+/CD45RO-
Memoria	CD27+/CD45RO+
Efectora	CD27-/CD45RO+
• T supresoras/citotóxicas	CD3+/CD8+/CD45+/CD4-
Naïve	CD27+/CD45RO-
Memoria	CD27+/CD45RO+
Efectora	CD27-/CD45RO+
• Células T reguladoras	CD3+/CD4+/CD45+/CD25+
• Células NK	CD3-/CD56+/ CD16+/CD45+/CD19-
• Células B	CD3-/CD19+/CD45+/CD56-/CD16-
• TRECs (*)	

La combinación de diferentes anticuerpos monoclonales, tal y cómo se especifica en la tabla permite identificar las diferentes subpoblaciones en la s.p. para el estudio de la reconstitución inmune. La cuantificación de TRECs ha sido determinada en las muestras de sangre periférica enviadas al Anthony Nolan Research Institute.

9.3. Evaluación del quimerismo.

Se ha realizado mediante análisis de secuencias del ADN discriminantes de las células del paciente, del receptor y de los productos trasplantados (SCU y PHM de donante

auxiliar). Las secuencias de ADN que pueden permitir la discriminación y que se han utilizado son las de los alelos de los diferentes loci HLA así como las secuencias STR (“short tandem repeats”) de los microsatélites (*vide infra*). Los alelos discriminantes de HLA son los marcadores que se utilizan como base para la determinación del quimerismo mediante el procedimiento de RSCA. Este método se utilizó para los primeros pacientes, antes de que se dispusiera del método de secuenciación, en el que como marcadores se utilizan los microsatélites.^{82,83}

9.3.1. Definiciones.

Se definen las diferentes situaciones de quimerismo como:

- *Quimerismo completo de SCU (QCC)*: detección únicamente de alelos de la SCU en las muestras analizadas; es decir, sin ADN del receptor o del donante auxiliar detectable.
- *Quimerismo completo de donante auxiliar (QC-DA)*: detección únicamente de alelos del donante auxiliar en las muestras analizadas; es decir, sin ADN del receptor o de la SCU.
- *Quimerismo completo doble (QC-D)*: No detección de ADN del receptor y presencia de ADN detectable de la SCU y del donante auxiliar.
- *Quimerismo mixto (QM)*: detección de ADN del receptor y de la SCU y/o del donante auxiliar. Puede tratarse de un quimerismo mixto precoz (QM p), cuando se detecta inmediatamente después del trasplante, sin que previamente en ninguna muestra se haya detectado quimerismo QC o de quimerismo mixto tardío (QM t), cuando previamente el paciente ha estado en QC.
- *Reconstitución autóloga (RA)*: presencia exclusiva de ADN del receptor, sin que se detecte ADN de células de la SCU o del donante.

En los pacientes objeto de este estudio se han realizado evaluaciones de quimerismo post-trasplante en diferentes poblaciones celulares obtenidas de muestras de sangre periférica y de médula ósea y también, de lesiones cutáneas de EICH, en los distintos momentos evolutivos post-trasplante. Las evaluaciones globales del quimerismo se han

realizado sobre el ADN de muestras sin previa separación de poblaciones celulares. La evaluación selectiva del quimerismo mieloide se ha realizado sobre granulocitos aislados mediante la técnica del Ficoll, recogándose la capa de células correspondiente a los granulocitos, en tanto que la evaluación del quimerismo en células mononucleadas (CMN) y en poblaciones linfocitarias se ha realizado tras el asilamiento de las mismas por el procedimiento que se describe más abajo.

9.3.2. Aislamiento de subpoblaciones linfocitarias

Obtención de células mononucleadas (CMN).

Se hace a partir de las muestras de sangre periférica recogidas en tubos BD VacutainerTM de 10 mL con Heparina Sódica. (BD vacutainer Systems, Plymouth, UK). Se realiza una separación mediante Ficoll-Hypaque (Sigma-Diagnostics, St. Louis, MO, NJ; densidad 1.077g/mL) recogándose la interfase que contiene las CMN (linfocitos, monocitos y células NK), que se lava con medio RPMI estéril (centrifugación durante 3-5 min. a 2500-3000 r.p.m, con freno). Se retira el sobrenadante por decantación y se añade solución de lisis (Sigma-Aldrich) para retirar los hematíes. Tras 5-7 min. a temperatura ambiente se realiza otro lavado y el botón de células se resuspende en salino tamponado (PBS, 2mM EDTA, 0.5 %BSA). La concentración y viabilidad celular se determinan mediante conteo por microscopía directa utilizando el colorante de exclusión vital Azul Tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Separación de diferentes subpoblaciones NK, CD19+ CD3+, CD4+ y CD8+. Se realiza mediante el separador automático de Miltenyi (*AutoMacs Miltenyi Bistec*), con la siguiente metodología: Por cada millón de células a separar, se añaden 20 µL del anticuerpo correspondiente (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56/16, anti-CD19), dependiendo de la subpoblación deseada (MACS system; Miltenyi Biotec, GMBH Gladbach, Alemania). Se incuba durante 15 min. a 4°C, tras lo que se hace un lavado con 2 mL de buffer de separación a 2300 r.p.m. x 2 min. Se retira el sobrenadante y se añaden 500 µL del mismo buffer. Se lleva la muestra al separador automático de Miltenyi (Automacs) y se procesa según protocolo con el programa POSSELS-S. Las fracciones se traspasan a criotubos marcados y la muestra se deja a -20 °C hasta su uso.

9.3.3. Análisis de quimerismos en distintas poblaciones celulares

Extracción del ADN

Las células a analizar se resuspenden en tampón 0.25M Sacarosa, 50mM Tris-ClH pH7.5, 25mM ClK, 5mMCl₂Mg; a continuación se añade EDTA (concentración final 10mM), Proteinasa K (concentración final 50ug/ml) y SDS (duodecil sulfato sódico) a concentración final del 1%, y la mezcla se incuba a 55°C durante 8-16 horas. Tras esta incubación, se añade un tercio de volumen de una solución saturada de ClNa (6M), se agita fuertemente durante 15 segundos y se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 15 segundos; se recoge el sobrenadante, que contiene el ADN, y se desecha el precipitado del fondo del tubo (Millar,1998). A la fase acuosa así obtenida, se le añade un volumen igual de isopropanol consiguiéndose la precipitación del ADN, que es transferido a un tubo de 1.5 mL, lavado con etanol al 70%. La concentración del ADN se calcula tras medir su absorbancia (Espectrofotómetro U 2000 de Hitachi) mediante espectrofotometría con luz ultravioleta (260nm), aplicando la fórmula:

$$\text{ug de ADN/mL} = \text{D.O.}_{260} \times 50$$

en la que 50 es un factor de cálculo que corresponde a que una unidad de densidad óptica (D.O.) con una luz incidente de 260 nm es la absorbancia que tienen 50 ug de ADN/mL).

Tras la determinación de la concentración de ADN las muestras se almacenan en tubos de 1.5 ml a -20 °C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como la posible contaminación por microorganismo. De todas las muestras se prepara un tubo de trabajo a una concentración de 0,1 µg/ul, del que se toman las muestras para la amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cuantificación del quimerismo

En los casos trasplantados en los años iniciales el estudio del quimerismo se realizó mediante el método RCSA antes referido (descrito por Argüello y col.⁸²), utilizando como marcadores las secuencias ADN de loci HLA discriminantes. Con posterioridad se ha utilizado metodología de la PCR utilizando como marcadores las secuencias de

microsatélites discriminantes. Ambas técnicas permiten valorar cuantitativamente la contribución de células procedentes del paciente, del TSCU y de las células auxiliares en el “Trasplante Dual” en muestras de sangre periférica y de médula ósea, así como en muestras de lesiones cutáneas sospechosas de EICH, siendo la técnica PCR de mayor potencial para la detección de ADN de poblaciones minoritarias (sensibilidad del 1% frente al 3% de la técnica RSCA).⁵⁹

En el procedimiento de la PCR se obtiene la amplificación de un segmento de ADN localizado entre dos secuencias conocidas (Saiki, 1988), para lo que se precisa de una ADN polimerasa termoestable, capaz de soportar los distintos ciclos de temperatura a los que es sometido el ADN para conseguir separación de las dos hebras de la doble cadena del ADN cromosómico como paso previo a la fase de síntesis de las cadenas complementarias. Es de gran importancia el correcto diseño de los oligonucleótidos a utilizar en la reacción como cebadores.

Para la evaluación del quimerismos de los pacientes de este estudio se seleccionaron 16 marcadores STR de ADN marcados con fluorocromos (AmpFl STR® Identifier™ PCR Amplification Kit. Applied Biosystems), analizándose los segmentos amplificados de ADN discriminativos entre donante y receptor con el *secuenciador ABIPRISM 3100* (Applied Biosystem) y el *Software GeneMapper 3.0*.

9.4. Determinación de las moléculas de escisión del reordenamiento del receptor de las células T (TRECs) por PCR cuantitativa para evaluación de la función tímica.

Los TRECS son fragmentos de ADN de configuración circular que resultan del reordenamiento de genes en el proceso de diferenciación de linfocitos T en el timo. Son moléculas estables y no se amplifican durante la mitosis, repartiéndose entre las células resultantes de la división celular, de modo que la cantidad de células T portadoras de TRECs que se detecta en la sangre guarda proporción con la generación reciente de células T. Su cuantía decrece con la edad.⁸⁴ La determinación se realiza mediante una PCR cuantitativa a tiempo real.

En el estudio realizado en los receptores del TSCU, la amplificación de las de TRECS se ha realizado sobre células previamente seleccionadas como CD4+ y CD8+ con el *AutoMacs Miltenyi Bistec* (vide supra). Para la obtención de un lisado de células, el botón celular es tratado con proteinasa K utilizando 10 µL de solución a concentración de 100µg/ml por cada 1×10^5 células en el botón celular seco, que se añaden suavemente en la parte superior del mismo. Se mezcla y se incuba durante 2 horas a

56°C en un bloque térmico. Pasadas las dos horas se mezcla suavemente y se incuba a 95°C durante 15 minutos para inactivar el enzima tras lo que se centrifuga a 1300 r.p.m durante 1 minuto y se almacena a -70°C hasta su uso. Posteriormente, para la reacción de PCR, se utilizan 5 µl del lisado. La detección y cuantificación de moléculas de TRECs por PCR a tiempo real se hace utilizando el *secuenciador ABI 7500* y *SDS software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).^{85,86,87}

10.-Métodos de análisis estadísticos

Las variables descriptivas de las característica generales de las poblaciones del estudio, como porcentajes, medias, desviación estándar o típica, medianas, cuartiles, intervalos de confianza (I.C. 95%) y valores extremos, se han evaluado mediante métodos estadísticos de tendencia central y de dispersión.

Las comparaciones entre dos grupos de las variables continuas se realizaron con la prueba de la *t de Student* si no se rechaza la hipótesis de normalidad. Para los datos de dos grupos que no siguen distribuciones normales se han utilizado la prueba *U Mann-Withney* de contrastes no paramétricos.

La comparación de frecuencias se realizó mediante la prueba χ^2 de *Pearson* y χ^2 *corregido por continuidad*. Para todas las pruebas se aceptó un valor de significación inferior a 0,05 y bilateral.

Los **análisis de supervivencia** se realizaron utilizando los siguientes criterios:

- Supervivencia global. Eventos: Muertes por todas las causas.

- Supervivencia causa específica: Eventos: Muerte causa específica, incluye muerte por tumor y por toxicidad.
- Supervivencia libre de enfermedad (SLE). Eventos: Recidiva o Muerte por enfermedad.
- Estudio de recidivas. Eventos: Paciente con recidiva de la enfermedad.

Se estimaron todas las funciones de supervivencia y recidivas mediante el método del producto límite de *Kaplan-Meier*. Este método se basa en las probabilidades condicionadas y estima la probabilidad de supervivencia por encima de un tiempo t . El tiempo de supervivencia global se define como el intervalo entre el inicio del procedimiento y la muerte por tumor o por cualquier otra causa cuando se produce, o hasta el último seguimiento si el paciente vive. Las curvas obtenidas por este método han sido comparadas mediante el *test de logrank*.

Análisis de incidencias acumulativas de prendimiento y recidivas

La incidencia acumulada (IA) de eventos se ha valorado mediante el análisis de riesgos competitivos. En el análisis de supervivencia es práctica corriente, aunque incorrecta, tratar todos los fracasos por causas distintas a la de interés, como observaciones censuradas (vivos hasta ese momento) y estimar la incidencia usando la fórmula $1-KM$ (KM estimación de *Kaplan-Meier*). El problema de esta aproximación es asumir que la probabilidad de fracaso por estas causas antes del tiempo t es cero. Esto produce una sobreestimación de la incidencia acumulada de eventos, que puede ser sustancial cuando

son muchas las observaciones de este tipo. Podemos definir un *riesgo competitivo* como un evento cuya ocurrencia excluye la ocurrencia de otro bajo examen o fundamentalmente altera la probabilidad de ocurrencia de este otro evento. Cuando el prendimiento de plaquetas y granulocitos en el trasplante de cordón umbilical (TSCU) es un evento de interés, la muerte sin haber alcanzado el prendimiento es un *riesgo competitivo*, y también lo será la muerte por otro tipo de evento o la pérdida de control. El método de *Kaplan-Meier* considera estas situaciones como observaciones censuradas

en el momento en que el paciente fallece o se pierde. Esto implicaría que no sabemos si va a presentarse o no a partir de ese instante, cosa que no es cierta dado que el paciente ya falleció. Un estimador de la probabilidad de prendimiento al método *Kaplan-Meier*, es el que se conoce como incidencia acumulada (cumulative incidence) o probabilidad de fracaso o riesgo.

La variable respuesta debe acompañarse del tiempo en el que se produjo el evento, del tiempo hasta la muerte si esta se produce o hasta el último seguimiento si el paciente vive. Es decir que el estudio de cada evento conlleva controlar el tiempo en el que estos aparecen. También deben conocerse los tiempos de recuperación de granulocitos, plaquetas y hematíes, para calcular la incidencia de prendimiento.

Para el cálculo de las incidencias acumuladas se utilizó el programa NCSS versión 2005, y para el resto de los análisis estadísticos el programa SPSS versión 14.0.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Los datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 3. Son todos adultos, 30 varones y 16 mujeres, con edades entre los 16 a 60 años (mediana 34,5) y pesos corporales entre 43 a 95 Kg (mediana de 69) y todos ellos afectados de procesos oncohematológicos de alto riesgo de recidiva como indicación del trasplante. En 20 el TSCU fue motivado por LLA, de los que 10 presentaban cromosoma Ph1 y estaban en remisión completa (RC) en el momento del trasplante, 3 tenían marcadores mieloides, 2 se encontraban en remisión parcial (RP) y 7 estaban en RC segunda o posterior. Otros 12 pacientes presentaban leucemia mieloide aguda (LMA), de los que 4 estaban en remisión parcial o fase visible, 2 presentaban masas tumorales extramedulares (un sarcoma granulocítico extramedular uno y múltiples cloromas el otro), 5 estaban en RC (uno tras una recaída de un trasplante autólogo de médula ósea), 1 tenía mutación MLL y 1 presentaba características de leucemia aguda de células dendríticas. Leucemia mieloide crónica (LMC) fue el diagnóstico de 4 pacientes, de los que 1 estaba en segunda fase crónica y 3 en fase acelerada (uno de ellos tras trasplante autólogo). Síndrome mielodisplásico (SMD) fue el motivo del trasplante en 3 pacientes, 1 secundario a LNH, y otro una hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) evolucionada a hipoplasia con displasia. Por último, 5 pacientes tenían LNH, de los que 4 estaban en remisión inestable y 1 (un caso de linfoma Burkitt) en RC-2.

Positividad de serología pre-trasplante frente al CMV se dio en 41/46 (89%). La serología frente al toxoplasma fue negativa en veintitrés (23), positiva en catorce (14) y no conocida en los nueve (9) restantes. De los 23 pacientes negativos para toxoplasma, ocho recibieron células auxiliares de donantes sero-positivos.

Tabla 3.-Características de los pacientes:

Número total (N)	46
Género: Masculino (M)/Femenino (F)	30/16
Edades	6-60 años (mediana 34,5)
Pesos	3-95 Kg (mediana 69)
Serología de CMV	
Negativa	4
Positiva	41
Serología de toxoplasma	
Negativa	23
Positiva	14
Desconocida	9
Diagnósticos	
LMA	12
LLA	20
Leucemia de células dendríticas	1
LMC	4
Linfoma no-Hodgkin	5
SMD 2ª	3
HPN con aplasia/displasia	1
Factores de riesgo asociados:	
<i>Pacientes con LMA</i>	
• Remisión completa	5/12
• Cloromas	2/12
• Auto-trasplante previo	1/12
• Remisión parcial en fase visible	4/12
• Alteración MLL	1/12
<i>Pacientes con LLA</i>	
• Cromosoma Philadelphia	10/20
• Remisión completa	10/20
• Marcadores mieloides	3/20
• Remisión parcial	2/20
• > 2ª Remisiones parciales	7/20
<i>Pacientes con LMC</i>	
• 2ª Fase crónica	1/4
• Fase acelerada	3/4
• Auto-trasplante previo	1/4
<i>Pacientes con linfoma</i>	
• Linfoma de Burkitt RC-2ª	1/5
• Remisión inestable	4/5

LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda;
 LMC: Leucemia Mieloide Crónica, SMD: Síndrome Mielodisplásico.

De los tratamientos acondicionantes descritos en el apartado **métodos** el utilizado de forma preferencial para pacientes con procesos linfoproliferativos fue el b), en tanto que

el c) fue el utilizado de forma preferente para aquellos pacientes con procesos mieloproliferativos, utilizándose también para pacientes con otros procesos en los que se consideró contraindicado el empleo de ICT. El régimen d) empleado para pacientes en los que concurrían circunstancias singulares. El régimen a) fue utilizado sólo en los 3 primeros casos del estudio, dejándose de utilizar por su toxicidad especialmente en lo concerniente a mucositis, a favor de los otros regímenes referidos.

2. Datos de celularidad de las unidades de sangre de cordón trasplantadas en relación con el peso de los pacientes receptores.

Los datos relativos a la celularidad de las unidades trasplantadas se muestran en la Tabla 4. El número total de unidades trasplantadas fue de cuarenta y nueve (49), ya que tres pacientes tuvieron que recibir una segunda unidad por distintos motivos: fracaso de prendimiento de la unidad trasplantada en uno, rechazo del primer TSCU en otro y recidiva de LMA en un tercero. El número CNT con que las unidades figuraban en los inventarios de los correspondientes Bancos suponían la aportación a los pacientes de cantidades de CNT de $1,14$ a $4,30 \times 10^7$ por Kg de peso (mediana de 2,34). De 44 unidades se disponía de determinaciones del número de células CD34+ antes de la congelación, variando respecto al peso de los receptores entre $0,04$ y $2,86 \times 10^6/\text{Kg}$ (mediana de 0,10).

Tabla 4. -Datos de las unidades de cordón trasplantadas.

Datos precongelación		
Unidades	N	

CNT:	49	$1,14- 4,30 \times 10^7/\text{Kg}$ (mediana 2,3)
Células CD34+	44	$0,4 - 2,86 \times 10^6/\text{Kg}$ (mediana 0,10)
CFU:	49	$0,0 - 7,21 \times 10^4/\text{Kg}$ (mediana 2,42)
Compatibilidad ABO Paciente vs SCU		
Idénticos	15	
Incompatibilidad Menor	14	
Incompatibilidad Mayor	15	
Incomp. Mayor y Menor	2	
Compatibilidad HLA Paciente vs SCU		
	Rechazo	EICH
0/6	8	12
1/6	18	14
2/6	16	18
3/6	3	2

3. Características de los donantes de células auxiliares y contenido celular de sus donaciones de PHM

Los datos de los donantes auxiliares y de sus donaciones de PHM se muestran en las Tablas 5 y 6. Del total de 46 donantes auxiliares utilizados, 30 fueron varones y 16 mujeres. Para 31 de los pacientes el donante auxiliar fue un familiar HLA haploidéntico: la madre en 4, el padre en 2, hermano/a en 18 y otro familiar (hijo o sobrino) en 7. Para los 15 restantes se utilizaron personas, familiares o no, sin haplotipo HLA compartido.

Tabla 5.-Datos de donantes auxiliares

Donantes auxiliares utilizados	46 (M/F 30/16)
Familiar HLA haploidéntico	31
Madre	4
Padre	2
Hermano/a	18
Hijo/a	7
No haploidéntico	15
Distribución de donantes auxiliares según el tipo de selección de progenitores:	
Exclusivamente CD34+	32 (M/F 21/11) Edades 16-60 (36)
En parte CD34+ y en parte CD133+	4(M/F 4/0) Edades 35-57 (40)
Exclusivamente CD133+	10 (M/F 6/4) Edades 19-55 (40)

De 32 donantes auxiliares (21 varones y 11 mujeres con edades entre 16 y 60 años y mediana de 36), los PHM fueron seleccionados exclusivamente como células CD34+. De 4 de ellos (todos varones, con edades entre 35 y 57 años, mediana de 40) la selección fue hecha en parte como CD34+ y en parte como CD133+, con proporciones de CD133+ crecientes (1/3, 1/2, 3/4) lo que se hizo para evaluar la factibilidad del uso de células seleccionadas como CD133+. De 10 (4 mujeres y 6 varones, con edades entre 19 y 55 años y mediana de 40), la selección fue hecha exclusivamente como células CD133+.

Tabla 6.-- Datos de las unidades de PHM utilizadas (obtenidas de los donantes auxiliares)

	N
Total de unidades infundidas	46
PHM (CD34+ y/o CD133+) infundidas	1,05-2,84 x10 ⁶ /Kg (mediana 2,3)
CD3+ infundidas	0,05-1,56 x10 ⁴ /Kg (mediana 0,31)
Purificación	98%
Selección como CD34+	32
Células CD34+	1,05-2,78x10 ⁶ /Kg (mediana 2,33)
CD3+ infundidas	0,05-0,98x10 ⁴ /Kg (mediana 0,31)
Purificación	98%
Selección como CD133+	10
Células CD133+	2,00-2,84x10 ⁶ /Kg (mediana 2,37)
CD3+ infundidas	0,29-1,36 x10 ⁴ /Kg (mediana 0,31)
Purificación	97,8%
Selección mixta	4
Células CD34+	0,8-1,6x10 ⁶ /Kg (mediana 1,11)
Células CD133+	0,8-2,0x10 ⁶ /Kg (mediana 1,44)
Total CD34+ y CD133+	0,8-2,0x10 ⁶ /Kg (mediana 1,25)
Células CD3+	0,05-1,56x10 ⁴ /Kg (mediana 0,33)

Compatibilidad Paciente vs donante auxiliar en ABO

Idénticos	31
Incompatibilidad menor	9
Incompatibilidad Mayor	5
Incomp. Mayor y Menor	0
No determinada	1

Compatibilidad Paciente vs donante auxiliar en HLA

	Rechazo	EICH
2/6	12	9
3/6	20	22
4/6	4	6
5/6	4	3
6/6	5	5

Compatibilidad SCU vs donante auxiliar en ABO

Idénticos	18
Incompatibilidad menor	14
Incompatibilidad Mayor	10
Incomp. Mayor y Menor	3
No determinada	1

Compatibilidad SCU vs donante auxiliar en HLA

	Rechazo TPD	Rechazo SCU
3/6	17	18
4/6	10	7
5/6	4	5
6/6	5	5

La cantidad de PHM seleccionada en relación al peso del receptor varió entre 1,05-2,8 x10⁶/Kg. con una mediana de 2,3 x10⁶/Kg., con una cuantía de células CD3+ que varió entre 0,5 y 15,6 x10³/Kg. con una mediana de 3.3 x10³/Kg. En las selecciones exclusivas de CD34+ y de CD133+, la cuantía de PHM obtenida fue similar. El grado de pureza de las células PHM seleccionadas varió entre 90,23 y 99,4 (mediana del 98%), tanto en las selecciones de CD34+ como en las de CD133+, lo que supuso una depleción de células CD3+ del orden de 4 logs (variación de 3,47 a 5,47). No se observaron diferencias en los rendimientos de las aféresis que fueran de relevancia respecto a los objetivos de colecta perseguidos que fueran relacionables con edad, peso o sexo de los donantes.

4. Relación de compatibilidad HLA entre pacientes receptores, unidades de SCU trasplantadas y PHM co-infundidos.

Los datos de compatibilidad ABO y HLA entre pacientes y unidades de SCU trasplantadas se muestran en la Tabla 4 en tanto que en la Tabla 6 se muestran los datos correspondientes a compatibilidad ABO y HLA del paciente y de la unidad de SCU trasplantada frente a los PHM del donante auxiliar.

De las 49 unidades de SCU trasplantadas (tres como segundo trasplante), las diferencias en HLA con el paciente fueron de 0-3 (mediana 2) en el conjunto de los 6 loci A, B (a nivel antigénico) y DRB1 (a nivel alélico) tanto en sentido de rechazo como de EICH. De 46 unidades la identidad HLA de 6/6 la hubo en 8 casos. En sentido de rechazo, 18 unidades tenían 1/6 diferencias, 16 tenían 2/6 y en 3 las diferencias fueron 3/6, en tanto que en el sentido de EICH 14 tenían 1/6 diferencias, 18 tenían 2/6 y en 2 las diferencias fueron 3/6. En cuanto a compatibilidad ABO, 15 unidades fueron isogrupo, 14 presentaban incompatibilidad menor, 15 incompatibilidad mayor y 2 incompatibilidad mayor y menor.

Respecto a la relación de compatibilidad HLA A, B y DRB1 entre donante auxiliar y paciente, en el sentido de rechazo del donante auxiliar por el paciente, las diferencias fueron de 3 antígenos en 20, de 4 en 4, de 5 en otros 4 y de 6 en 5, mientras que en el sentido de alo-reacción del donante contra el receptor (improbable que pudiera ser

clínicamente relevante dado el mínimo número de linfocitos CD3+ del donante auxiliar infundidos) las diferencias fueron de 3 antígenos en 22, de 4 en 6, de 5 en 3 y de 6 en 5.

Respecto a la relación de compatibilidad HLA (A, B y DRB1) entre donante auxiliar y SCU, en el sentido de rechazo del donante auxiliar por las células del TSCU las diferencias fueron de 3 antígenos en 17, de 4 en 10, de 5 en 4 y de 6 en 5, mientras que en el sentido de reacción del donante contra las células del TSCU (de nuevo improbable que pudiera ser clínicamente relevante dado el mínimo número de linfocitos CD3+ del donante auxiliar infundidos) las diferencias fueron de 3 en 18, de 4 en 7, de 5 en 5 y de 6 en otros 5.

En cuanto a compatibilidad ABO entre paciente y donante auxiliar, 31 presentaban identidad, 9 incompatibilidad menor y 5 incompatibilidad mayor, no conociéndose en 1. Y en cuanto a compatibilidad ABO entre el TSCU y el donante auxiliar, hubo identidad en 18, en 14 incompatibilidad menor, en 10 incompatibilidad mayor y en 3 mayor y menor, desconociéndose en 1.

5. Recuperación de granulocitos y plaquetas tras el trasplante.

Datos de la recuperación de granulocitos neutrófilos y de plaquetas tras el trasplante, se muestran en las Tablas 7 y 8 y en las Figuras 6-a, 6-b, 6-c, 6-d y 6-e.

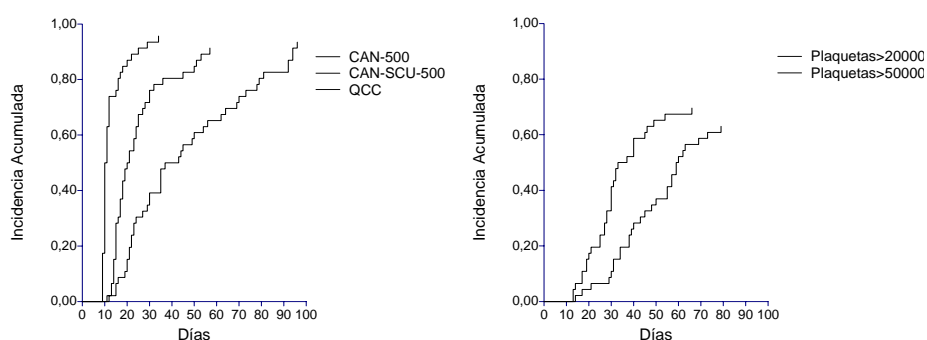


Figura 6a.-Curvas de incidencias acumuladas de recuperación de granulocitos y plaquetas en el conjunto de todos los pacientes (n=46).

Eventos competitivos: muerte o supervivencia sin recuperación.

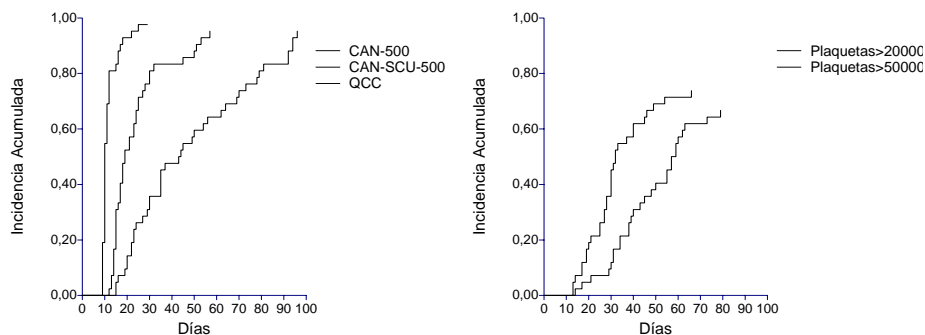


Figura 6b.-Curvas de incidencias acumuladas de recuperación de granulocitos y plaquetas en los pacientes con donante auxiliar no materno (n=42).

Eventos competitivos: muerte o supervivencia sin recuperación. La principal diferencia respecto a las curvas del conjunto de todos los pacientes es recuperación de granulocitos con una incidencia acumulativa máxima más alta y acortamiento de los tiempos correspondiente a percentiles por encima del P80

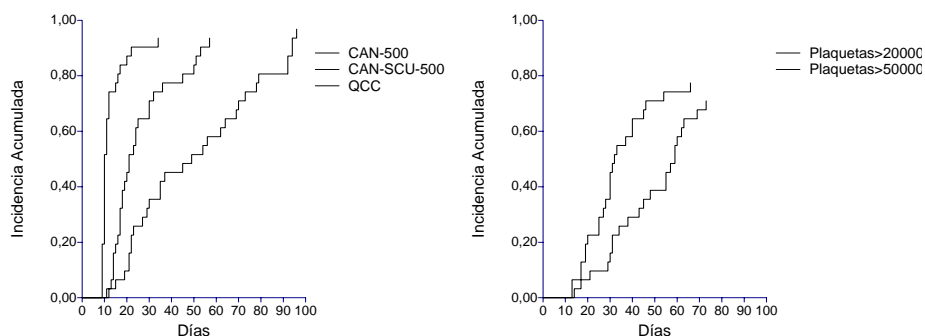


Figura 6c.-Curvas de incidencias acumuladas de recuperación de granulocitos y plaquetas en los pacientes de menos de 40 años (N=31).

Eventos competitivos: muerte o supervivencia sin recuperación.

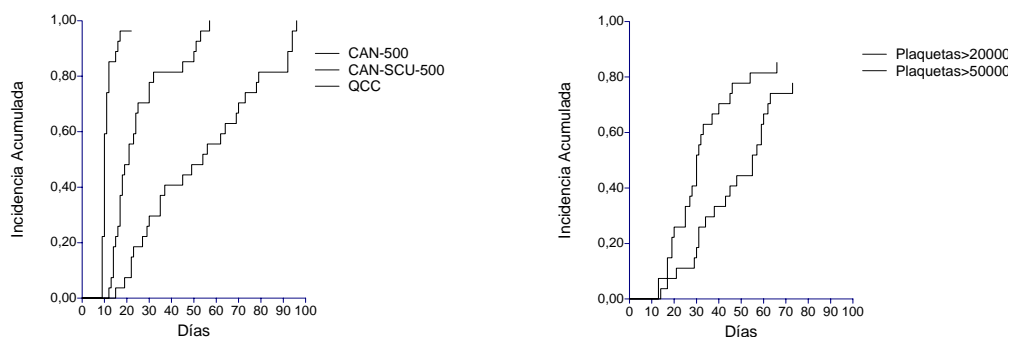


Figura 6d.-Curvas de incidencias acumuladas de recuperación de granulocitos y plaquetas en los pacientes de menos de 40 años con donante auxiliar no materno (N=31).

En este subgrupo de pacientes aparecen los valores más favorables en cuanto a más alta incidencia acumulativa máximas de recuperación y tiempos de recuperación más cortos en los percentiles por encima del P80

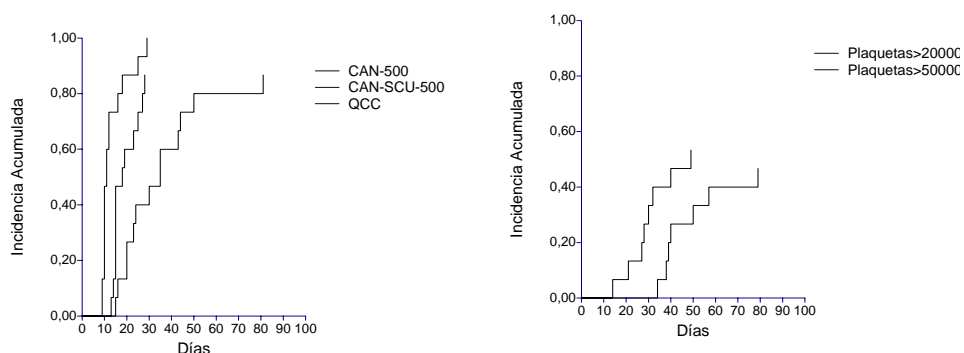


Figura 6 e.-Curvas de incidencias acumuladas de recuperación de granulocitos y plaquetas en los pacientes de más de 40 años (N=15).

En este subgrupo de pacientes aparecen los valores más desfavorables en cuanto incidencias acumulativas máximas de recuperación plaquetas, siendo la curva de recuperación de granulocitos similar a la los pacientes de menos de 40 años.

Tabla 7.- Datos del prendimiento del trasplante.

Todos los pacientes (N=46)

Recuperación CAN $>0.5 \times 10^9/L$

Días para la recuperación: mediana (rango) 10 (9-34)
IAM (y 95% IC) 0,96 (0,89-1,00)

Recuperación CAN-SCU $>0.5 \times 10^9/L$

Días para la recuperación: mediana (rango) 19 (12-57)
IAM (y 95% IC): 0,91 (0,83-1,00)

Quimerismo completo del TSCU

Días hasta el QCC: mediana (rango) 37 (11-96)
IAM (y 95% IC): 0,96 (0,86-1,00)

Recuperación de plaquetas

Días hasta $>20 \times 10^9/L$: mediana (rango) 33 (13-96)
IAM (y 95% IC): 0,70 (0,58-0,84)
Días hasta $>50 \times 10^9/L$: mediana (rango) 59 (14-240)
IAM (y 95% IC): 0,65 (0,53-0,80)

IAM = índice acumulativo máximo

Tabla 8.-Datos de prendimiento del trasplante (por subgrupos)

	Todos	Dte Aux no-materno	Dte Aux no-materno y pte<40 años	Pte<40 años
Número de pacientes	46	42	27	31
Recuperación CAN >0.5x10 ⁹ /L				
Día para la recuperación				
Percentil 50	10	10	9	9.5 días
Percentil 90	24	17	15	22 días
IAM de 0,96 a	34	23	19	34 días
95% IC de IAM	0,89-1,00	1,00-1,00	1,00-1,00	0,85-1,00
Recuperación CAN-SCU >0.5x10 ⁹ /L				
Tiempo hasta la recuperación				
Percentil 50	20	18	20	20 días
Percentil 90	56	51	50	53 días
IAM de 0,96 a	57	57	53	57 días
95% IC de IAM	0,83-1,00	0,89-1,00	1,00-1,00	0,85-1,00
Quimerismo completo del TSCU				
Tiempo hasta la recuperación				
Percentil 50	37	43	51	47días
Percentil 90	93	93	93	93 días
IAM de 0,955 a	96	96	94	95 días
95% IC de IAM	0,86-1,00	0,89-1,00	1,00-1,00	0,90-1,00
Recuperación de plaquetas				
Tiempo hasta >20 x 10 ⁹ /L				
P50	33	31	29	31 días
IAM de 0,71 a	96	54	41	46 días
95% IC de IAM	0,58-0,84	0,61-0,88	0,73-1,00	0,64-0,93
Tiempo hasta >50 x 10 ⁹ /L				
P50	59	57	53	56 días
IAM de 0,69 a	240	240	62	72 días
95% IC de IAM	0,53-0,80	0,57-0,84	0,70-0,98	0,60-0,91

IAM = índice acumulativo máximo				
IC = intervalo de confianza				

En 4 de los pacientes trasplantados a comienzos del estudio, se utilizó a sus madres como donantes auxiliares, no observándose en ninguno de ellos prendimiento de granulocitos procedentes del donante auxiliar.

En la tabla 7 se muestran los datos de días hasta la recuperación de CAN, CAN-SCU (calculado en función del CAN y de la proporción de ADN de SCU) y QC (medianas y rangos), así como las máximas incidencias acumulativas (IAM) con sus intervalos de confianza (IC) del 95% para el conjunto de todos los pacientes (N=46) de los que en la figura 6-a se muestran las curvas acumulativas de recuperación del número absoluto de neutrófilos (CAN) de forma mantenida por encima de $0,5 \times 10^9/L$ (CAN-500), la del número absoluto de neutrófilos derivados del TSCU (CAN-SCU) también por encima de $0,5 \times 10^9/L$ (CAN-SCU-500) y de la consecución del quimerismo completo de SCU (QCC).

Datos más detallados para el conjunto de todos los pacientes y para los subgrupos resultantes de la exclusión de los casos con donante auxiliar materno, así como excluyendo los pacientes de más de 40 años y donante auxiliar materno y un tercer grupo con los menores de esta edad se muestran en la Tabla 8.

La Figura 6-a y 6-b muestra las curvas acumulativas de recuperación de CAN, CAN-SCU y de QCC correspondientes al conjunto de todos los pacientes y al grupo de donante auxiliar no-materno (N=42) y en las Figuras 6-c, 6-d y 6-e aparecen, respectivamente, las curvas correspondientes a todos los pacientes de menos de 40 años (N=31), a los menores de esta edad con donante auxiliar no-materno (N=27) y a los pacientes mayores de 40 años (N=15), respectivamente.

Para *el conjunto de todos los pacientes* (N=46), los datos de recuperación del CAN-500 son: P50 de 10 días (rango 9-34) y P-90 de 24 días, con IAM de 0,96 alcanzada a los 34 días (95% IC de 0,89-1,00). Los datos de recuperación de CAN-SCU-500 son: P50 de 20 días (rango 12-57) y P-90 de 56 días, con IAM de 0,96 a los 57 días (IC-95% de 0,83-1,00). Los datos de QCC son: P50 de 37 días (rango 11-96), P90 de 93 días e IAM de 0,955 (95% IC de 0,89-1,00) a los 96 días.

Para *los pacientes con donante auxiliar no-materno* (N=42), los datos de recuperación de CAN-500 son: P50 y P90 de 10 y 17 días, con IAM de 0,96 % a 23 días (95% IC de 1,00-1,00). Los datos de recuperación de CAN-SCU-500 son P50 de 18 días y P90 de 51 días e IAM de 0,96 (95% IC de 0,89-1,00) a los 57 días y los datos de QCC, P50 de 43 días y P90 de 93 días, con IAM de 0,955 (95% IC de 0,89-1,00) a los 96 días

Para los pacientes de menos de 40 años con donante auxiliar no maternos (N=27), los datos de recuperación de CAN-500 son P50 y P90 de 9 y 15 días, con IAM de 0,96 a 19 días (95% IC de 1,00-1,00). Los de recuperación de CAN-SCU-500 son P50 de 20 y P90 de 50, con IAM de 0,96 (95% IC de 1,00-1,00) a los 53 días y los de QCC, P50 de 51 días, P90 de 93 días e IAM de 0,955 (95% IC de 1,00-1,00) a los 94 días.

Las gráficas de la Figura 7 muestran la progresión del quimerismo del donante auxiliar y del TSCU en granulocitos y células mononucleadas de sangre periférica, de una muestra de 28 pacientes. Estos datos, al igual que los obtenidos de análisis del ADN extraído de células de aspirados medulares (no mostrados), son indicativos de un marcado predominio inicial de elementos celulares provenientes del donante auxiliar, con incremento progresivo a lo largo de la evolución post-trasplante de la proporción de ADN de la SCU hasta alcanzar en último término un QCC. Se puede apreciar que la evolución hacia el QC-SCU en granulocitos es menos constante que el de CMN, lo que es relacionable con la utilización de G-CSF tras la inicial superación del umbral de $1 \times 10^9/L$.

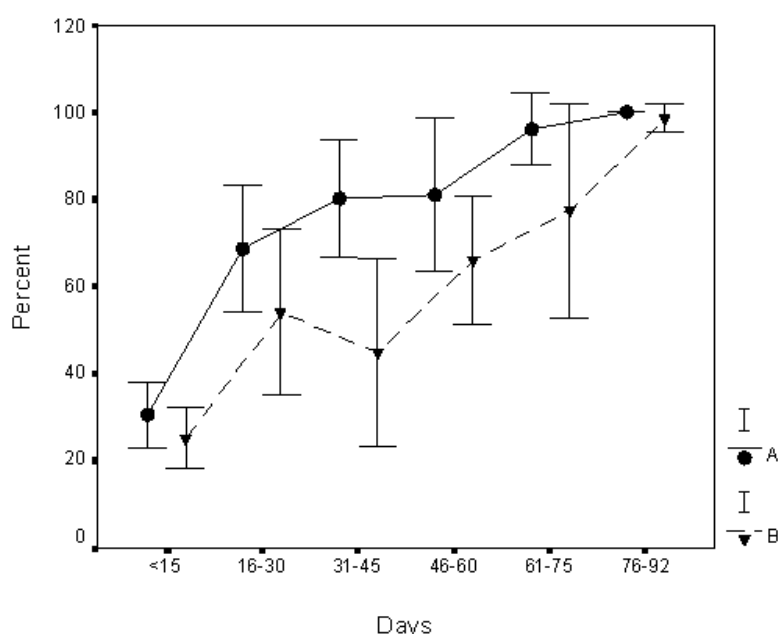


Figura 7.-Evolución del % ADN de SCU en células mononucleadas y granulocitos en muestras de sangre periférica.

Progresión del prendimiento del cordón (SCU). Los valores son medianas con intervalos de confianza del 95%.

- Proporción de ADN de SCU en células mononucleadas. (A)
- ▼ Proporción de ADN de SCU en granulocitos (B)

Las mayores oscilaciones en el perfil de recuperación de granulocitos es explicable por la variable administración de G-CSF (después de la recuperación de granulocitos los pacientes recibieron las mínimas dosis de G-CSF necesarias para mantener el CAN por encima de $1000/\mu l$)

Las Figuras 6 a-e muestran los gráficos de la recuperación de plaquetas mostrándose los correspondientes datos en las Tablas 7 y 8. La curva acumulativa de superación del umbral de $20 \times 10^9/L$ del conjunto de todos los pacientes muestra un P50 de 33 días (rango 13-96) e IAM del 0,71 (95% IC de 0,58-0,84) alcanzada a los 96 días, siendo los valores correspondientes para el umbral de $50 \times 10^9/L$, P50 de 59 días (rango 14-240) e IAM de 0,69 (95% IC 0,53-0,80) alcanzada a los 240 días.

Casos singulares

En uno de los pacientes se produjo recuperación de CAN en 10 días y de plaquetas $>20 \times 10^9/L$ a los 37 días, manteniendo a los 30 días cifras de granulocitos normales y linfopenia, con médula normocelular, sin requerimientos trasfusionales de plaquetas o hematíes y sin ADN de la SCU detectable en células circulantes ni en las de la médula. Los controles realizados tras descongelación en la unidad de SCU que le fue trasplantada mostraban ausencia de células CD34+ detectables y falta de crecimiento de colonias (CFU) en los cultivos, por lo que se decidió infundir una segunda unidad de SCU tras la administración de Flu ($30 \text{mg/m}^2 \times 3$ días) y ALG (dosis $30 \text{mg/Kg.} \times 3$ días). Este segundo TSCU fue seguido de la aparición de ADN de la segunda SCU tanto en médula como en células de la sangre en el día +15, hasta alcanzar QC-SCU de la segunda unidad tanto en granulocitos como de mononucleadas a los 44 días del segundo TSCU y a los 78 del primero, con un periodo de neutropenia de sólo 10 días tras el primer TSCU, sin pasar por nueva fase de neutropenia o trombopenia. (Fig. 8)

Otro paciente, que tuvo también la habitual pronta recuperación de CAN (10 días) con predominio inicial de los de procedencia del donante auxiliar, presentó inicio de prendimiento del TSCU que fue seguido de progresión y posterior declive del mismo hasta su desaparición. El paciente mantuvo un CAN normal por células derivadas fundamentalmente del donante auxiliar y sólo transitoriamente con un componente de TSCU, sin requerimientos trasfusionales, pero con QM (presencia de ADN propio) primeramente en mononucleadas de sangre periférica y médula ósea y, posteriormente en granulocitos tanto de sangre como de médula. La administración de un segundo TSCU tras preparación con Flu, ATG y ICT 200 cGy fue seguido del prendimiento del mismo con QCC a los 15 días, sin que tampoco pasara por una segunda fase de neutropenia o trombopenia.

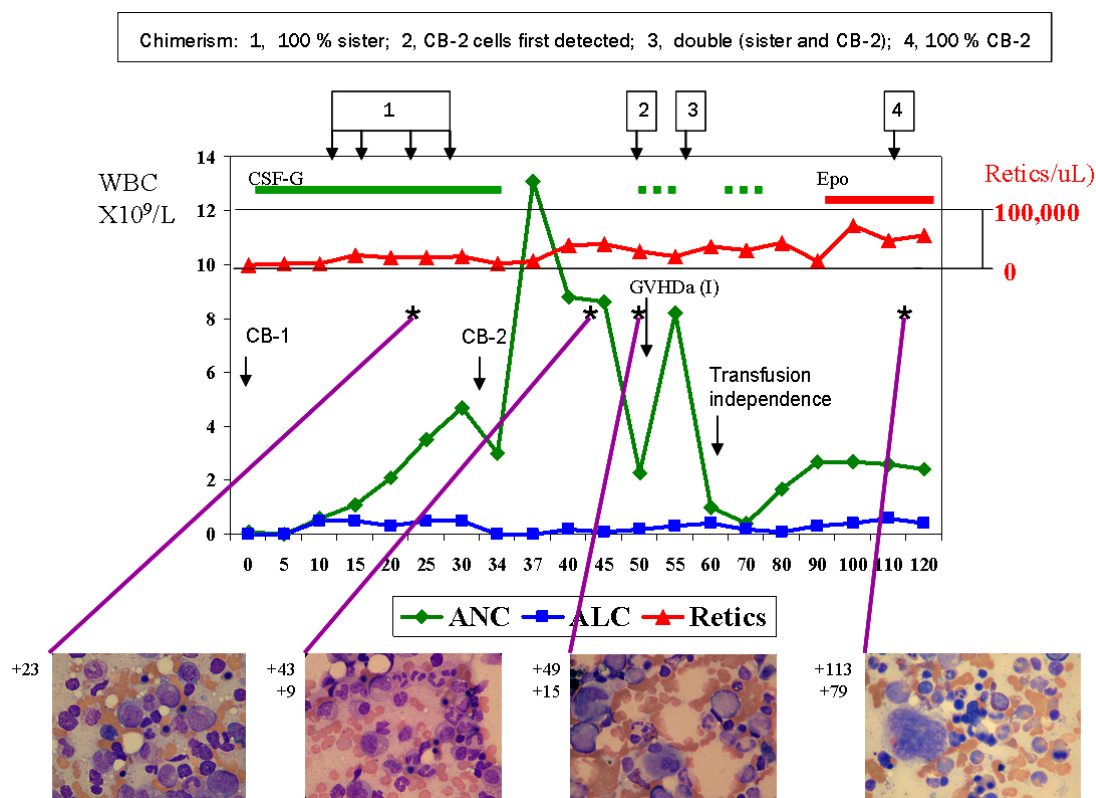


Figura 8.- Evolución del paciente JGC en el que la unidad trasplantada en primer término resultó carente de progenitores hematopoyéticos viables. Se produjo precoz prendimiento de las células del donante auxiliar con lo que se mantuvo un nivel adecuado de granulocitos con mínimos requerimientos transfusionales hasta que se alcanzó el prendimiento de la unidad trasplantada en segundo término, aproximadamente un mes después de la primera. Antes del segundo trasplante el paciente solo recibió Fludarabina y ATG, sin que se produjera citopenia secundaria.

6. Recuperación de sistema inmune

La figura 9 muestra la evolución de la recuperación de las poblaciones linfocitarias de los pacientes. La realización de la cuantificación diferencial de las distintas subpoblaciones linfocitarias no resultó factible con un número absoluto de linfocitos (CAL) circulantes por debajo de los 200/ μ l ($0,2 \times 10^9$ /L), que los pacientes no han superado sino después de alcanzar el QCC en la población de CMN, de modo que, los datos obtenidos de cuantificaciones diferenciales corresponden en todos los casos a células derivadas exclusivamente de TSCU, sin componente de células derivadas del donante auxiliar o autólogos.

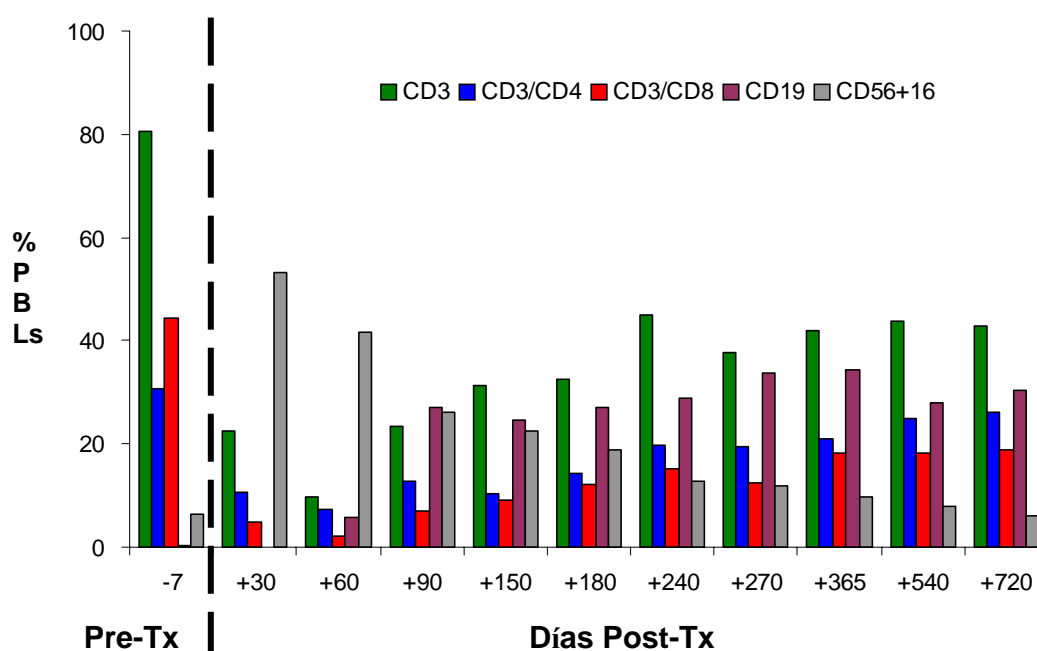


Figura 9. -Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en los receptores de TSCU dual.

Las barras representan porcentajes (%) de las distintas subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica en los pacientes sometidos a TSCU dual a lo largo del tiempo. A la izquierda de la raya vertical de trazos se muestran los porcentajes de las distintas subpoblaciones de linfocitos antes de iniciar el tratamiento acondicionante del trasplante.

En el estudio por inmunocitometría los datos muestran un predominio inicial de células NK (identificadas como CD56+/CD16+) con posterior aumento en las proporciones de células B (identificadas como CD19+) y más tardíamente de la de linfocitos T (identificados como CD3+). Las figuras 10 a-e muestran la evolución de los datos de contajes absolutos de linfocitos (CAL) en sangre periférica correspondientes a las subpoblaciones NK (CD56+/CD16+), B (CD19+), T totales (CD3+), T CD3+/CD4+, T CD3+/CD8+ y T-reguladoras (CD4+/CD25+). Las medianas de los valores de células NK y de células B se situaron dentro de los respectivos rangos de normalidad a partir del mes 1 al 3 (Fig. 10-a, 10-b). En cambio, las medianas de los valores de CD3+ totales y de CD3+/CD8+ no alcanzaron el rango de normalidad hasta después de los 9 meses y la de los CD3+/CD4+ hasta pasados los 12 meses (Fig. 10-c).

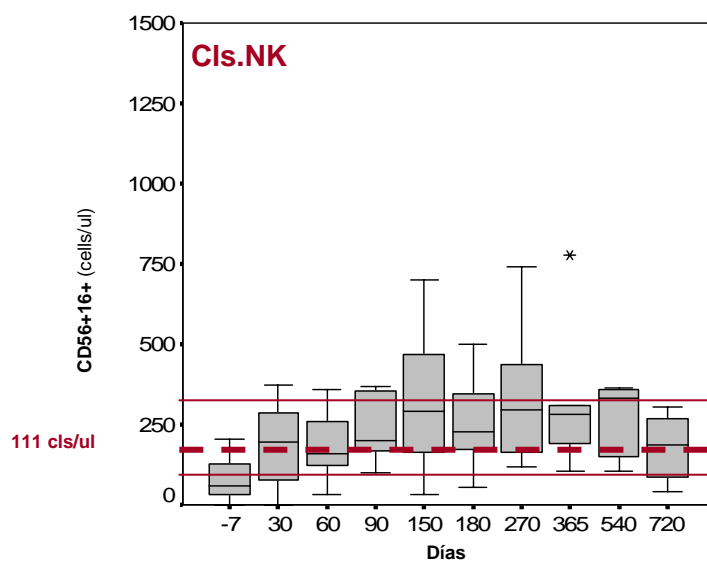


Figura 10-a.-Recuperación de las células NK en s.p. tras el TSCU dual.

Las células NK se han cuantificado como células CD56+CD16+.

Las referencias de valores normales corresponden a mediana y rango entre percentiles P25 y P75.

Recuperación de niveles normales de células NK a partir del primer mes post-trasplante.

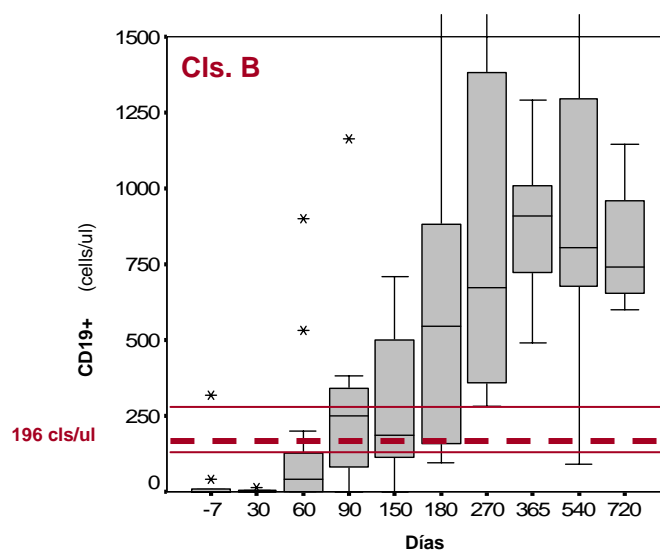


Figura 10-b.-Recuperación de los linfocitos B en s.p. tras el TSCU dual.

Las células B se han cuantificado como células CD19+.

Las referencias de valores normales corresponden a mediana y rango entre percentiles P25 y P75.

Recuperación de niveles normales de células B, CD19+ a partir del tercer mes post-trasplante.

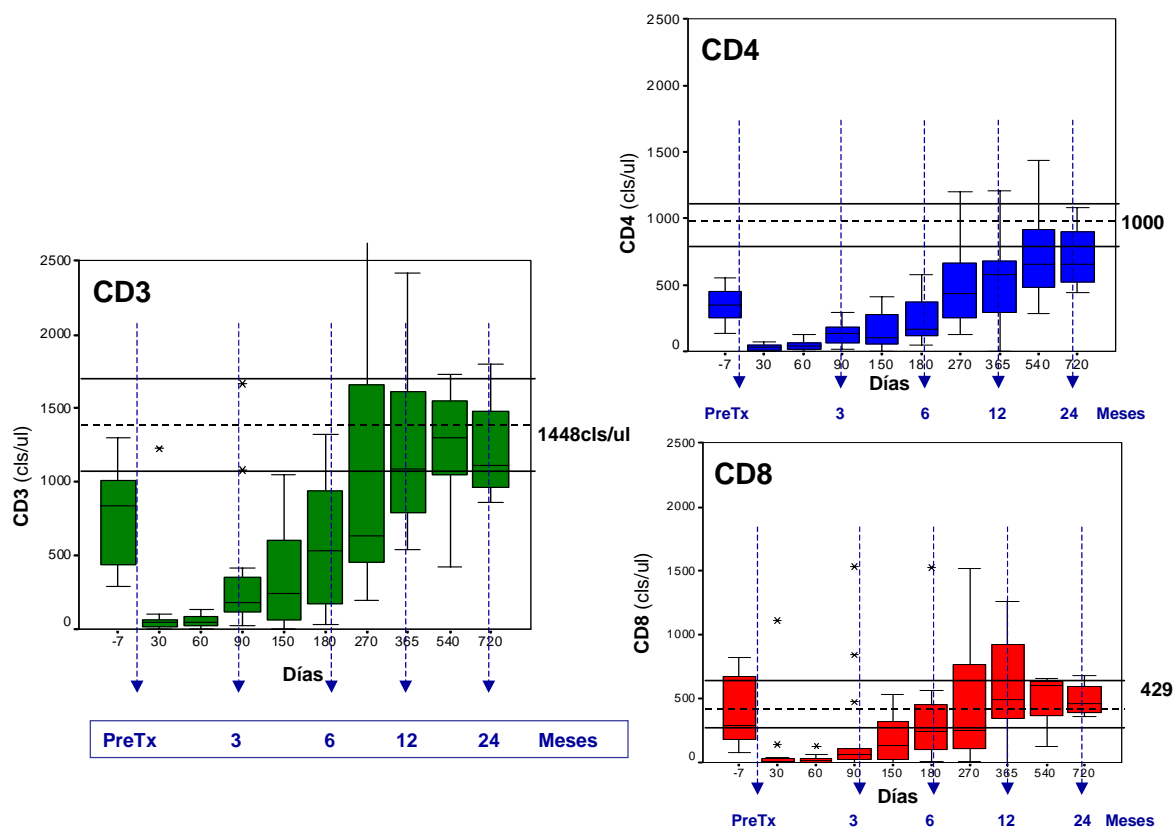


Figura 10-c.-Recuperación de los linfocitos T en s.p. tras el TSCU dual.

Las células T se han cuantificado como células CD3+, como CD4+ y como CD8+.

Las referencias de valores normales corresponden a mediana y rango entre percentiles P25 y P75.

Recuperación al año de niveles normales de células T CD3+ totales, si bien las subpoblaciones no alcanzan niveles de normalidad hasta meses más tarde dentro del segundo año, siendo más tardía la recuperación de los CD4+ que la de los CD8+.

El estudio de la reconstitución inmune en los pacientes fallecidos en distintos momentos del trasplante ha mostrado datos de recuperación de linfocitos T por debajo de los de los pacientes supervivientes, no habiéndose observado relación con parámetros tales como número de células infundidas o diferencias en el HLA, si bien el número de datos disponible no permite valoraciones fiables de posibles correlaciones (Fig. 10-d).

Finalmente, la recuperación de los linfocitos T-reguladores (CD4+/CD25+) no ha alcanzado valores medianos dentro del rango de normalidad hasta bien entrado el segundo año post-trasplante (Fig. 10-e).

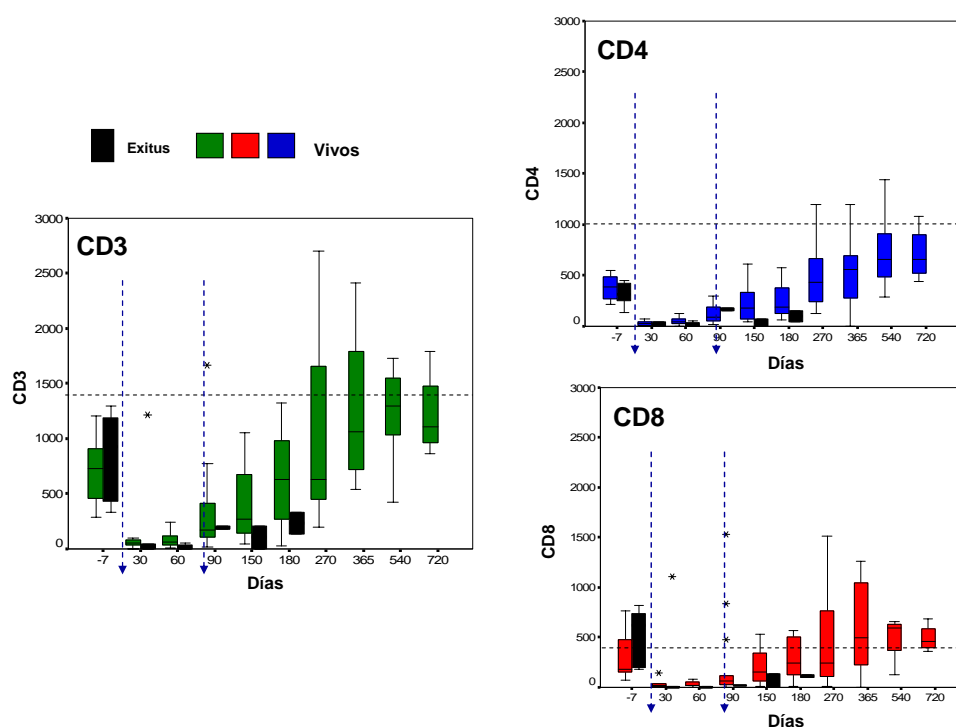


Figura 10-d.-Recuperación de los linfocitos T en s.p. tras el TSCU dual.

Las células T se han cuantificado como células CD3+, como CD4+ y como CD8+. Se muestran por separado valores correspondientes a pacientes supervivientes y los de pacientes fallecidos. Peor recuperación de poblaciones linfocitarias T en pacientes fallecidos

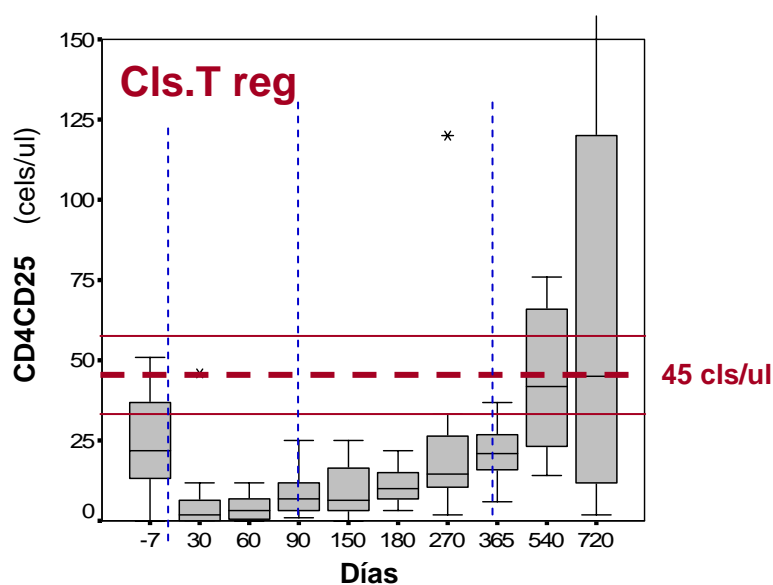


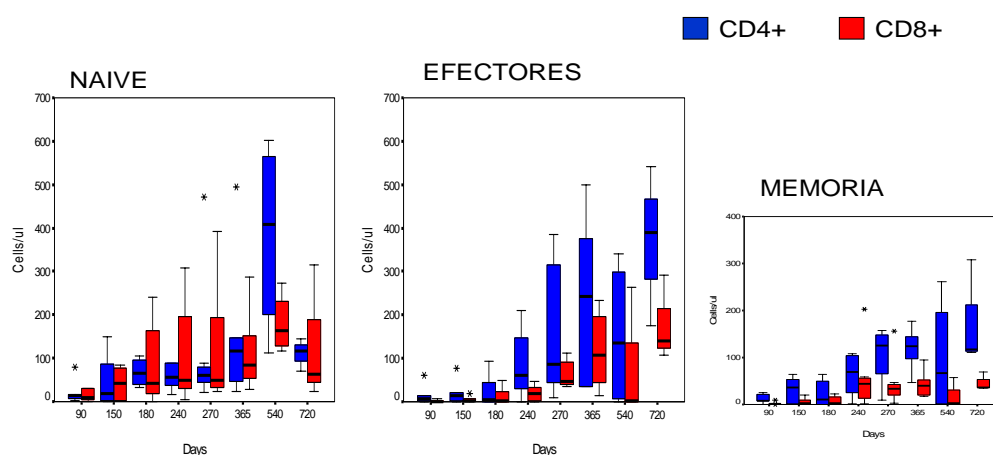
Figura 10-e.-Recuperación de los linfocitos T reguladores B en s.p. tras el TSCU dual.

Las células T-reg. se han cuantificado como células CD4+CD25+
La referencia de valores normales corresponde a mediana y rango entre percentiles P25 y P75.
Recuperación de niveles normales de células T reguladores a partir de mediados del segundo año post-trasplante.

Los análisis de los fenotipos “naive”, *efector* y *memoria* de los linfocitos CD3+ muestran un predominio inicial de los de fenotipo “naive” en las subpoblaciones de linfocitos CD8+ y CD4+ que se extiende hasta el sexto mes, con posterior predominio de los de fenotipo efector y memoria (Figura 11).

Figura 11.-Distribución de poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ por inmunofenotipo *naive*, *memoria* y *efector* en la evolución post-trasplante de receptores de TSCU dual

Predominio de inmunofenotipo “naive” en los primeros 9 meses post-trasplante. Progresivo incremento de células CD4+ de inmunofenotipo efector y memoria a partir del mes 8º, momento en el que también se registra incremento de las células de estos inmunofenotipos en la población CD8+, aunque en cuantía menor.



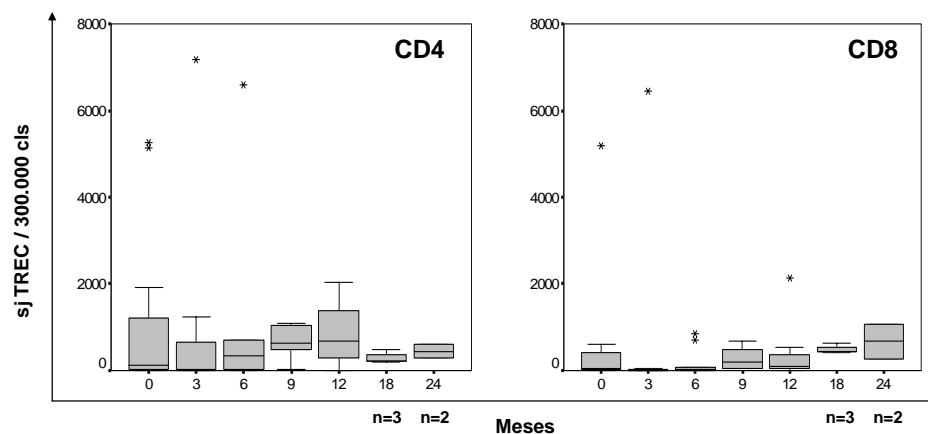
Las determinaciones de TRECs, (disponibles sólo para pacientes trasplantados con posterioridad a diciembre de 2004), muestran la presencia de proporciones variables de células portadoras de los mismos en distintos momentos tras el TSCU (Tabla 9 y Figura 12). A los 3 meses las células T portadoras de TRECs son, salvo alguna excepción, indetectables o sólo presentes en muy bajo número. A partir del 6º mes su número tiende a aumentar pero permaneciendo en general, por debajo de los valores de normalidad de referencia, sin que los datos disponibles permitan todavía, debido fundamentalmente al tamaño de la muestra de pacientes estudiado hasta el momento, análisis de correlación con variables tales como edad de los pacientes, compatibilidad HLA, desarrollo de manifestaciones EICH y otras.

Tabla 9.- Datos de TRECs

Sub-poblacion	Meses	Casos		
		Válidos	Perdidos	Total
		N	N	N
CD4	0	14	3	17
	3	8	9	17
	6	9	8	17
	9	8	9	17
	12	7	10	17
	18	3	14	17
	24	2	15	17
CD8	0	14	3	17
	3	8	9	17
	6	9	8	17
	9	8	9	17
	12	7	10	17
	18	3	14	17
	24	2	15	17

En la tabla se muestra el número de casos en los que han sido analizados los TRECs (CD4 y CD8) a diferentes intervalos desde el TSCU.

Cuantificación de TRECs tras Tx Dual



Donantes normales: N = 90; Mediana edad 34 años. (22 - 53)

CD4: 897 Copias /300,000 cells ($\bar{X} \pm 2S$: 660 -1132)

CD8: 793 Copias /300,000 cells ($\bar{X} \pm 2S$: 457- 1229)

P Travers & A Prieto (ANRI), Marzo 2007

Figura 12.-Cuantificación de TRECs en receptores de TSCU dual

Presencia de TRECs en linfocitos CD4+ y CD8+ en cuantía baja respecto a los valores de referencia en población normal. Si bien los datos disponibles al cierre del estudio podrían indicar una cierta tendencia a lento incremento progresivo, los mismos son insuficientes para una valoración fiable y para analizar posibles correlaciones con distintas variables.

7. Complicaciones tóxicas

Al inicio del estudio, 3 de los pacientes recibieron un acondicionamiento intensivo (a) con radioterapia a dosis de 12 cGy. De ellos, 2 fallecieron de forma muy temprana, uno por toxicidad (EVO) y el otro por una infección por CMV.

De aquellos pacientes que recibieron el acondicionamiento b), cuatro de ellos presentaron muerte por toxicidad antes de los dos meses post-trasplante. Todos pacientes previamente muy tratados y las causas fueron FMO (2), EVO (1) e infarto cerebral (1). De los que recibieron acondicionamiento con Bus (c) hubo un caso, que también se trataba de un paciente muy tratado previamente al TSCU, que falleció por FMO en tanto que otro falleció por fallo de prendimiento, tanto de las células del donante auxiliar como de la unidad de SCU infundida inicialmente y de la que fue administrada con posterioridad. Son en total 7 fallecimientos por causas tóxicas: 2 por EVO, 3 por FMO, 1 por infarto cerebral y 1 fallo de prendimiento (Tabla 10).

Tabla 10.-Principales causas de muerte (20/46 pacientes fallecidos)

Recidiva	1	
Tóxicas	7	(2 EVO, 1 infarto cerebral, 3 FMO, 1 fallo del injerto)
EICH	4	
Infecciones	8	(3 CMV, 1 VEB, 1 Cándida, 1 toxoplasma, 1 tripanosoma y 1 no determinada)

Con los acondicionamientos de IR, los pacientes han presentado una baja incidencia de mucositis severa, de modo que los requerimientos de nutrición parenteral han sido infrecuentes y, en todo caso, por tiempo muy limitado.

8. Complicaciones infecciosas

La incidencia de infecciones relacionadas con la neutropenia ha sido prácticamente irrelevante. Las principales de ellas se han observado con posterioridad a la recuperación de los neutrófilos (CAN), tratándose en su gran mayoría de infecciones debidas al déficit de la inmunidad protectora. (Tabla 11).

Tabla 11.-Infecciones durante el trasplante de SCU (virales y no-virales)

<u>NO-VIRAL</u>		<u>VIRAL</u>	
Toxoplasma (SNC)	3 (†)	HZV	12
Tripanosoma	1 (†)	HHV-6	3
Leishmania	1	EBV-LPD	1 (†)
Hongos (cándida)	4 (†)	Poliomavirus	7
Listeria (sepsis)	2	RSV	1
Reactivación Tb	2	HBV (Ag reaparición)	4
Neumonía (pseudomona, post viral)	1	CMV antigenemia	43/49
		CMV enfermedad	5/49 (†††)

† = casos con resultado de muertes (7/46);
(Otra muerte presuntamente por infección no determinada)

Las infecciones más frecuentes han sido las *reactivaciones por CMV* que han aparecido en el 70% de los casos, la mayor parte de las mismas (91%) en los tres primeros meses tras el TSCU (43 episodios de un total de 49), continuándose produciendo con posterioridad pero con una incidencia decreciente (Figura 13). En 5 ocasiones se ha producido un cuadro de *enfermedad por CMV* (gastritis en 2 y neumonía en tres 3), que ha sido la causa del fallecimiento en 3 de los mismos.

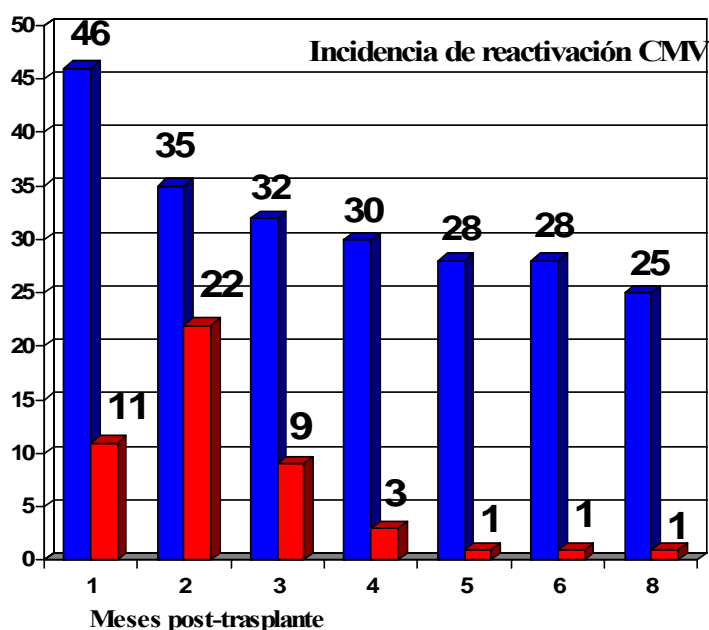


Figura 13.- Reactivaciones de CMV post trasplante, detectadas por antigenemia y/o PCR.

Las barras azules representan pacientes en riesgo y las barras rojas el número de reactivaciones observadas

Máxima incidencia en el segundo mes con progresiva reducción de la relación de reactivaciones a pacientes en riesgo

Otras infecciones virales frecuentes, observadas más tardíamente (a partir de los 4-6 meses post-trasplante), han sido las *reactivaciones* de *otros virus herpéticos* (N=16). Las reactivaciones del VHZ (N=12) han ocurrido como infecciones de localización radicular (10/12 casos) y como cuadros diseminados (varicela) en 2 ocasiones, todos los cuales se resolvieron con el tratamiento antiviral (Aciclovir). El *virus herpes tipo 6* se detectó por PCR en la sangre en tres pacientes; dos de los cuales cursaron con fiebre de forma temprana, en los días +12 y +13 y uno posteriormente, a los cuatro meses, desarrolló una meningitis linfocitaria por VH tipo 6 y el tercer caso permaneció asintomático en todo momento. Todos los episodios se resolvieron favorablemente con tratamiento antiviral. En 1 paciente se desarrolló, a los 11 meses del trasplante, un Síndrome linfoproliferativo (SLP) de localización faríngea e intracraneal con características de linfoma difuso de célula grande B inducido por *VEB*. Se trató con quimioterapia tipo CHOP más Rituximab y Radioterapia local sin éxito y con el resultado final del fallecimiento por esta causa.

Cistitis hemorrágica fue desarrollada por 7 pacientes, la mayoría dentro de los primeros dos meses post-trasplante, todos relacionables con infección vírica: en 1 *CMV* y en 6 *poliomavirus humano* tipos *BK* o *JC*, resolviéndose la mayoría con tratamiento antiviral específico o *cidofovir* (empleado en cuatro casos) con erradicación del virus y mejoría de la clínica salvo en una ocasión. En otros 7 pacientes se detectó presencia de *poliomavirus* por PCR en las analíticas de orina de control sin manifestaciones de cistitis hemorrágica.

Se han producido 4 episodios de “seroconversión inversa” del *VHB* en el curso del post-trasplante. Se trataba de pacientes que presentaban, previo al TSCU, la serología de una hepatitis B pasada [con presencia de anticuerpos anticore positivos (AgHBc+) y Ag de superficie negativo (AgHBs-)] en los que en algún momento del trasplante se observó una “seroconversión inversa” con aparición de positividad a AgHBs y datos analíticos de hepatitis. Todos ellos han requerido tratamiento específico con *lamivudina*; uno de ellos ha desarrollado, a pesar del tratamiento una cirrosis hepática secundaria por lo que sigue en tratamiento continuado y otro y otro permanece con carga viral elevada tras 7 meses a pesar de tratamiento específico.⁸⁸⁻⁹⁰

Se han observado 3 casos de infección clínica por *toxoplasma*. El primero se detectó en el año 2001 en un varón de 18 años que debutó con un cuadro de manifestaciones neurológicas (crisis convulsivas) desarrollado en el día +37 del trasplante y los otros dos, se observaron en Julio-2003 y Marzo-2004, siendo la infección la principal causa de fallecimiento en uno de éstos. Uno de los pacientes (el que fallece) tenía una serología negativa a toxoplasma antes de trasplante, no habiéndose podido determinar el mecanismo del desarrollo de la infección que causó su muerte. A partir de 2004, se incluyó en el protocolo de TSCU la terapia profiláctica que se describe en Materiales y Métodos, no habiéndose observado desde entonces ningún otro caso entre los pacientes incluidos en este estudio.

En un paciente se observó a los cuatro meses post-trasplante un cuadro de fiebre y deterioro del estado general con presencia de *granulomas caseificantes* en la médula y ante la sospecha de una *reactivación tuberculosa* se inició tratamiento específico con mejoría del estado general y regresión de las lesiones medulares. En otro caso, se ha observado al año del trasplante, la reactivación de una infección tuberculosa que se presentó como una neumonía de evolución tórpida; en el TAC de Alta Resolución se observó la presencia de una masa pulmonar en la que por biopsia se demostró la presencia de granulomas específicos. Coincidiendo con este episodio la paciente presentó un herpes zoster. Ambos cuadros se resolvieron con tratamientos específicos.

Un paciente presentó un cuadro de *leishmaniasis visceral* a los 6 meses, que se trató con tratamiento con Ambisome^R, resolviéndose el cuadro agudo pero permaneciendo con tratamiento antifúngico de por vida. Otra de las infecciones parasitarias que se han observado ha sido una reactivación aguda de la *enfermedad de Chagas*, por un *Trypanosoma cruzi*, que cursó con fiebre persistente y un cuadro de miocarditis, encefalitis e insuficiencia renal y provocó la muerte del paciente en el día +37 del trasplante a pesar de haberse iniciado el tratamiento específico con benznidazol (10mg/Kg/día v.o.); el origen de ésta se comprobó a posteriori, que fue debido a una de las transfusiones que el paciente había recibido durante el tratamiento quimioterápico en otro Centro. Esta observación ha dado lugar a la adopción en España de pruebas relativas a esta infección en los donantes procedentes de áreas de endemia de esta enfermedad.

Respecto a infecciones fúngicas, cabe destacar que no se han observado casos en que haya podido documentarse infección por hongos filamentosos, mientras que si se documentaron cuatro episodios de infección por *Cándida*, uno de ellos causante de muerte, según hallazgo en la necropsia (no diagnosticada ante-mortem).

Como infecciones bacterianas con riesgo vital son de señalar dos sepsis por *Lysteria monocytogenes*, ocurridas en los 15 primeros días del trasplante, detectadas en los hemocultivos realizados tras episodios de fiebre mantenida, ambos episodios se resolvieron con el tratamiento antibacteriano.

En conjunto, fueron 8 los pacientes fallecidos en los que una infección fue la principal causa de muerte: 3 por *CMV*, 1 por *VEB*, 1 por *Cándida* y 1 por *toxoplasma*, 1 *tripanosoma* y 1 no determinada (Tabla 10).

9. Incidencia de EICH

Episodios de EICH agudo se observaron en 28 pacientes (el 68%), todos con manifestaciones con posterioridad al día +11. En su mayoría han sido episodios con intensidad grados I-II que respondieron al tratamiento con corticoides y sólo en 4 de ellos alcanzaron intensidad de grado III-IV, siendo en 2 causa de fallecimiento en fases precoces tras el TSCU (entre los días +20 y +33). Uno de estos pacientes no había recibido globulina anti-timocito como parte de su acondicionamiento.

Los estudios de ADN de las biopsias de piel con EICH a grado >I demostraron la presencia de ADN del cordón en 2 de 5 casos estudiados, no habiéndose detectado en ninguno presencia de ADN del donante auxiliar.

Manifestaciones de EICH crónica se han observado en 12 pacientes de los 35 pacientes en riesgo es decir con más de 100 días de supervivencia (34%), siendo causa de fallecimiento en uno. El resto de los cuadros de EICH crónica son leves, limitados a nivel de piel y mucosas y de hígado y se han controlado con tratamiento inmunosupresor y de soporte. En 1 caso se ha dado a un cuadro de bronquiolitis obliterante que precisa de tratamiento.

10. Recidivas

Recidivas de la enfermedad sólo se han observado en 4 de los 46 pacientes, con una incidencia del 14%. Una ha ocurrido en un paciente trasplantado por LLA Ph1+, que ha alcanzado remisión molecular tras tratamiento con Glivec e interferón, manteniendo el QCC. Otra corresponde a un paciente con LLA Ph1 negativo, trasplantado en RC1, que recayó al año del trasplante. Un tercer caso corresponde a un LNH de alto grado con una recaída extra-medular, que ha respondido a tratamientos quimioterápicos sin perder el QCC. El último caso de recidiva corresponde a una paciente trasplantada por LMA que no respondió al tratamiento quimioterápico, logrando la RC tras la administración de quimioterapia, PH y células NK del donante auxiliar, y recuperando QCC. Tras permanecer varios meses en RC tuvo una nueva recidiva que no fue controlable, falleciendo por *Candidiasis invasiva* tras una prolongada citopenia (Figura 14).

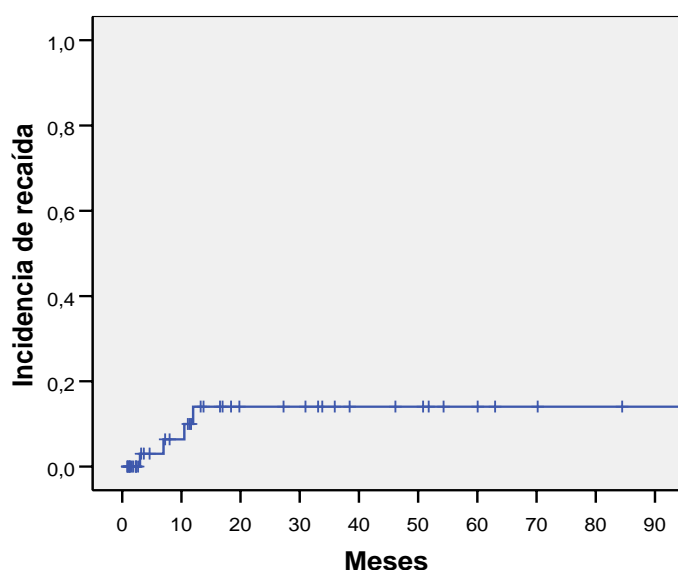


Figura 14.-Incidencia de recidivas en el grupo total de trasplante (4/46, 14%)
No se han observado recidivas después del mes 12

11. Supervivencia y mortalidad relacionada con el trasplante (MRT)

Al finalizar el estudio en Mayo-07, con seguimientos de 0,87 a 98 meses (mediana de 13,5) habían fallecido 20 de los 46 pacientes (43,5%). Sólo 1 por causa no directamente relacionable con el trasplante (recidiva), correspondiente las 19 restantes (41.3%) a MRT (Tabla 10 y Fig. 15). Como ha quedado anteriormente expuesto, la principal causa

de MRT fueron las infecciones (8 fallecimientos, 3 *CMV*, 1 *Toxoplasmosis*, 1 *Tripanosomiasis*, 1 *Candidiasis*, 1 *EBV-ELP* y 1 no determinada) seguida por la toxicidad del acondicionamiento (6 fallecimientos, 2 por EVO, en 3 por FMO (en pacientes previamente multi-tratados y en 1 por infarto cerebral) y de EICH (causa de muerte 4). Fallecimiento por fallo del prendimiento, tanto de las células del donante auxiliar como de la unidad de SCU infundida inicialmente como de la administrada con posterioridad, sólo ocurrió en 1 (un paciente multi-tratado con un probable déficit del microambiente hematopoyético).

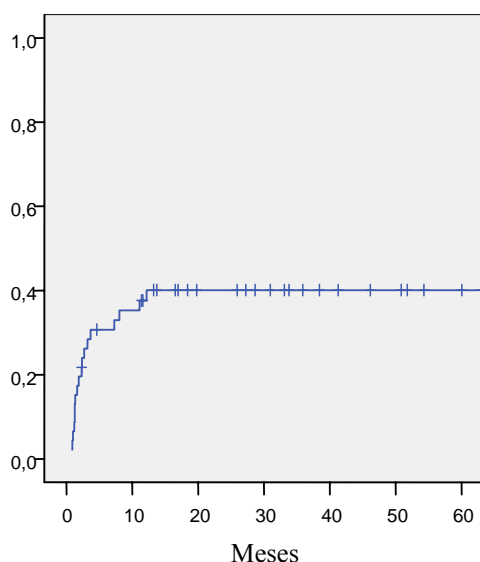
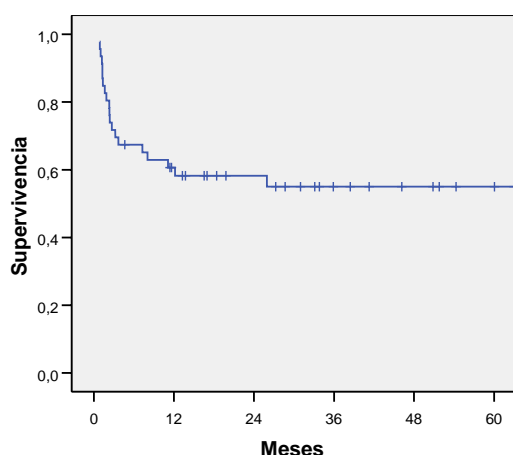


Figura 15.-Mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) en el grupo de pacientes (n=46)
Curva actuarial K-M

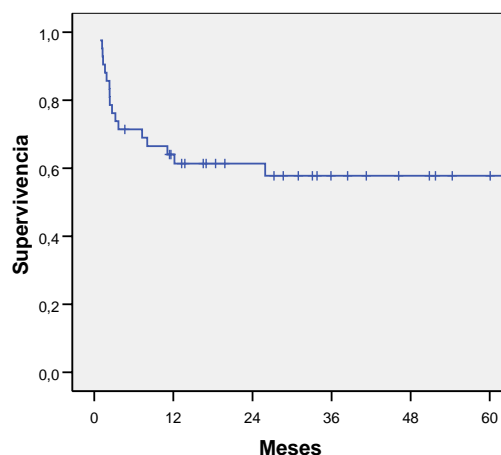
Las curvas actuariales de supervivencia son demostrativas de una supervivencia global del 55% a los 26 meses en el conjunto de todos los casos, del 61 % en los casos (N=42) con donante auxiliar no-materno, del 63% a los doce meses si excluimos a los pacientes mayores de 40 años (N=31) y del 73 % a los 12 meses en los pacientes de menos de 40 años con donante auxiliar no materno (N=27). (Fig.16 a-d)

Las supervivencias libres de enfermedad han sido del 51,5 % a los a los 12 meses en el conjunto de todos los casos, del 54 % al año en los casos con donante auxiliar no-materno (N=42), del 57% en el grupo sin mayores de 40 años (N=31) y del 62 % a los 12 meses en los pacientes de menos de 40 años con donante auxiliar no materno (N=27). (Fig. 17 a-d)

En las figuras 18 a-b se comparan las curvas de supervivencia global y de SLE de los pacientes de menos y más de 40 años de edad. En lo concerniente a supervivencias globales, 63% a los 26 meses para los más jóvenes y del 40% a los 12 meses para los mayores. En lo referente a SLE, 57% y 40 %, respectivamente, a los 12 meses. Las diferencias no alcanzan significación estadística (valores de p de 0,104 y de 0,224, respectivamente).



Figuras 16-a.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia global en el grupo total (n=46)
55 % a los 26 meses.



Figuras 16-b.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia global en el grupo de pacientes con donante auxiliar no materno (n=42)
61% a los 12 meses.

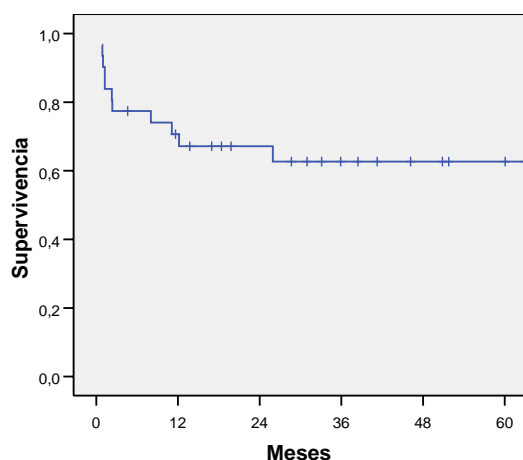
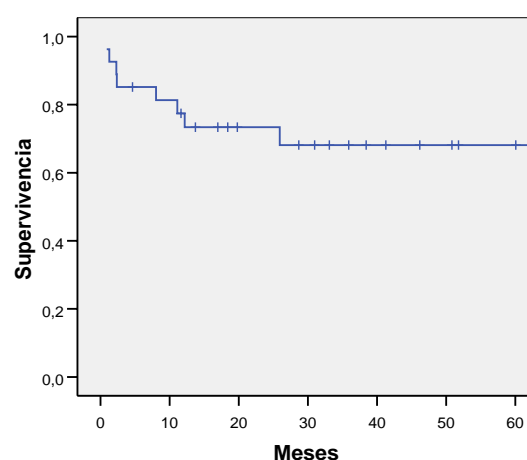
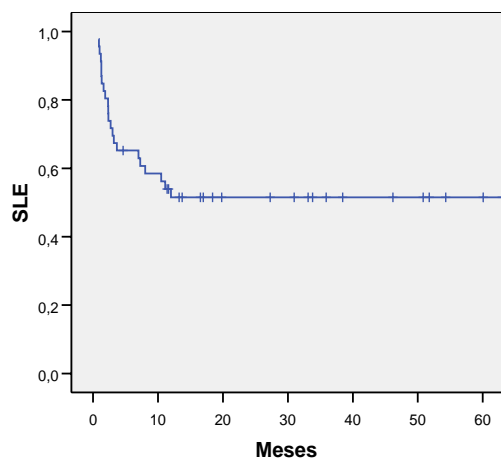


Figura 16-c.- Curva actuarial (K-M) de supervivencia global en el grupo de pacientes menores de 40 años (n=31)
63% a los 26 meses.

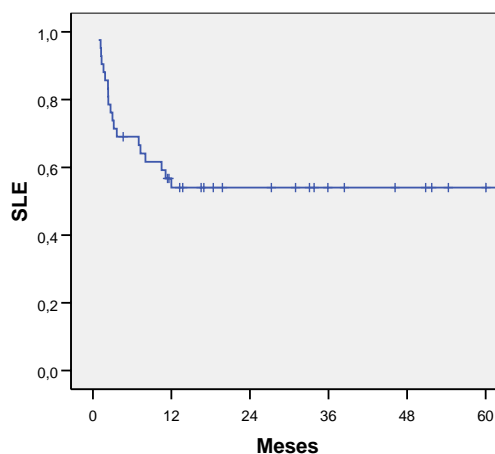


Figuras 16-d.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia global en el grupo de pacientes de menos de 40 años y donante auxiliar no-materno (n=27)
73 % a los 26 meses.



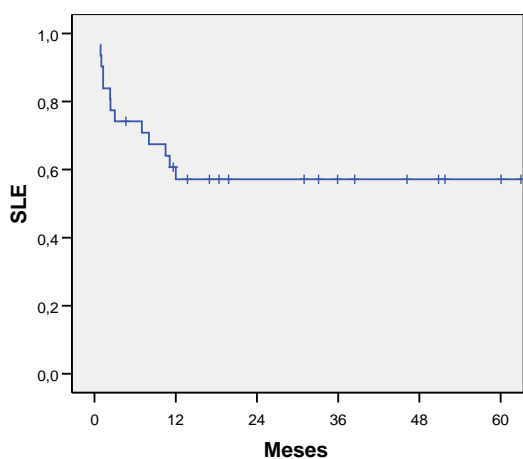
Figuras 17-a.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en todos los pacientes (N=46)

51,5% a los 12 meses



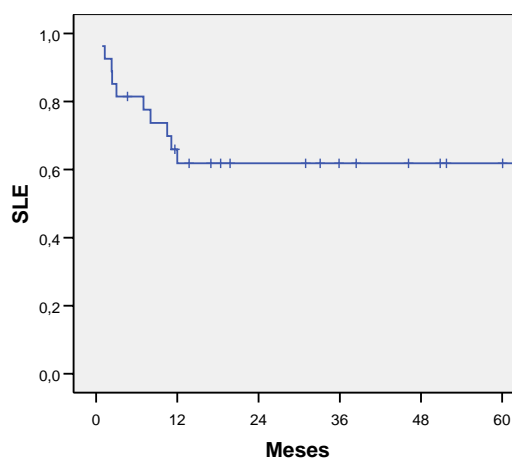
Figuras 17-b.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en los pacientes con donante auxiliar no materno (n=42).

54 % a los 12 meses.



Figuras 17-c.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en los pacientes menores de 40 años (n=31).

57 % a los 12 meses.



Figuras 17-d.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en los pacientes menores de 40 años con donante auxiliar no materno (n=27)

62% a los 12 meses

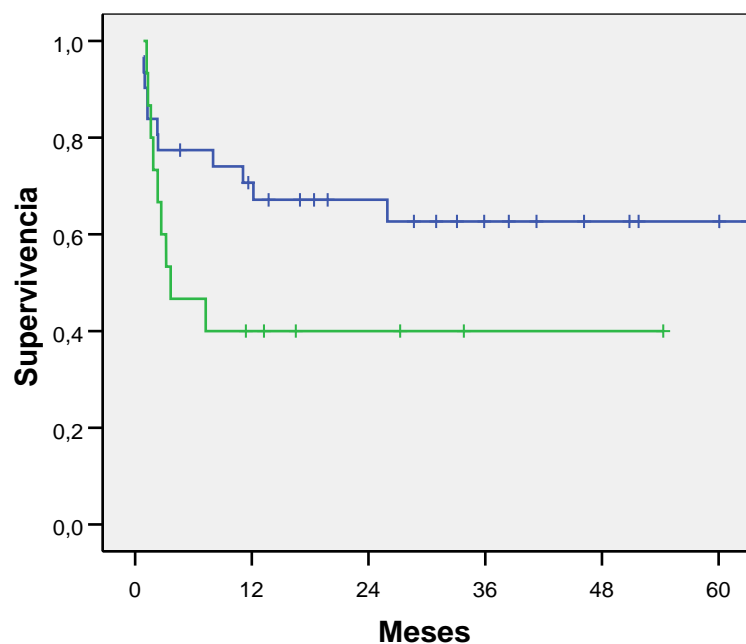


Figura 18a.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia global en el grupo de pacientes menores de 40 años (n=31) y de más edad (n=15)

En azul pacientes menores o igual a 40 años (supervivencia del 63% a 26 meses)

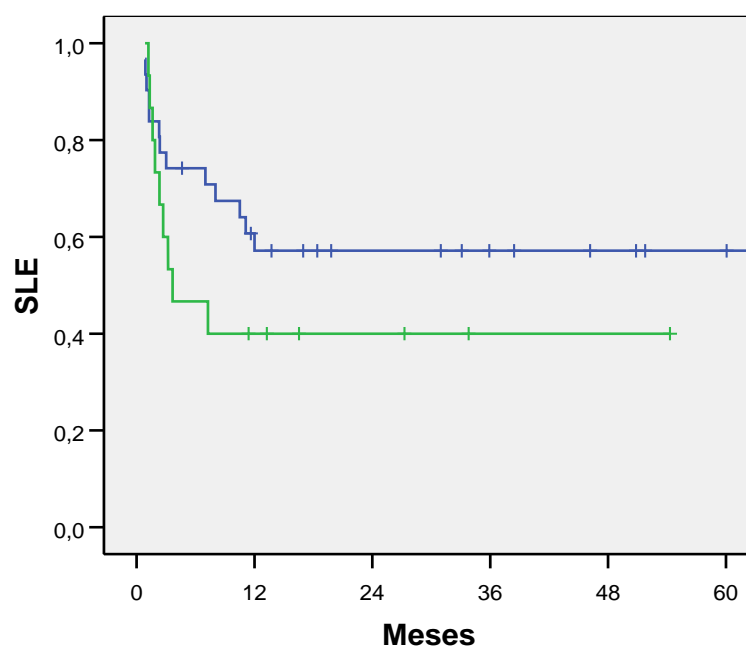


Figura 18b.-Curva actuarial (K-M) de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en el grupo de pacientes menores de 40 años (n=31) y de más edad (n=15)

En azul pacientes menores o igual a 40 años (supervivencia del 57% a 12 meses)
En verde los mayores de 40 años (supervivencia del 40% a 12 meses).
(p=0,224)

En resumen, los resultados de supervivencia en su conjunto comparan favorablemente con los de otros estudios de TSCU en pacientes adultos trasplantados por patologías oncohematológicas de alto riesgo, siendo de especial relevancia que las infecciones posteriores al prendimiento han sido la principal causa de morbi-mortalidad y que la segunda causa más frecuente han sido las complicaciones tóxicas, en gran medida relacionadas con la condición general de los pacientes del estudio, siendo de destacar la

baja proporción de fallecimiento por fallo de prendimiento, tradicionalmente una causa importante de MRT en los TSCU hechos al modo convencional.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El análisis de la bibliografía relativa al empleo clínico del TSCU para el tratamiento de procesos neoplásicos pone de manifiesto que, hasta el comienzo de la presente década, los resultados se caracterizaron por una MRT significativamente mayor que para otros tipos de TPH, identificándose como factores contribuyentes a la misma:

- a) Tiempo relativamente largo hasta la recuperación de granulocitos y plaquetas, dando ocasión al desarrollo de complicaciones infecciosas y hemorrágicas, factores contribuyentes a que en una proporción relativamente alta de casos, se produjera fallecimientos antes del prendimiento.
- b) Utilización de unidades de contenido celular sub-óptimo como factor contribuyente al prendimiento tardío y a fallos del mismo,
- c) Toxicidad de los tratamientos acondicionantes utilizados, de intensa acción inmunosupresora y mieloablativa, con efectos especialmente adversos en pacientes previamente muy tratados, dada la tendencia a la utilización del TSCU como último recurso, tras otras opciones de tratamiento (sin o con TPH), por ser considerado alternativa de alto riesgo de fracaso.

Por otra parte, la revisión expuesta pone también de manifiesto que, pronto tras su introducción en la práctica clínica, se reconoció que con los TSCU hay posibilidad de conseguir prendimientos hasta con tres disparidades en antígenos del sistema HLA correspondiente a los loci A y B clase I a nivel antigénico y al DRB1 de clase II a nivel alélico (que en otras modalidades de trasplante son de consecuencias catastróficas) con baja incidencia de EICH y con EICT de eficacia no menor que en otras formas de TPH. La observación de esta posibilidad de traspasar barreras HLA supuso la apertura de perspectivas de ampliar considerablemente el número de pacientes con posibilidad de beneficiarse de un TPH, que de esta manera podía dejar de considerarse restringido a la disponibilidad de un donante con alta identidad HLA, familiar o no relacionado: donantes familiares HLA geno-idénticos o con sólo mínimas diferencias HLA o donantes no relacionados con alto grado de identidad en toda la amplitud del sistema HLA.

También pronto tras su introducción en la práctica clínica se reconoció que al tardío prendimiento de los TSCU contribuyen no sólo la cantidad relativamente baja de PH infundidos sino también la naturaleza especialmente primitiva de la mayor parte de los mismos. Tras el reconocimiento de la importancia del contenido celular de las unidades trasplantadas respecto a prendimiento y supervivencia, así como la influencia del grado de disparidad HLA sobre la relación entre estos parámetros y el contenido celular de las unidades trasplantadas, los grupos trasplantadores han venido centrando sus esfuerzos en desarrollar diferentes estrategias dirigidas a conseguir acortamiento de los tiempos de citopenias post-acondicionamiento y a aumentar el potencial de prendimiento de las unidades trasplantadas. Todos estos esfuerzos se han canalizado en varias direcciones:

- a) Uso de unidades de alto contenido celular respecto al peso del paciente y de alta compatibilidad HLA.
- b) Intentos de expansión “ex vivo” de los PH previamente a su infusión.
- c) Uso de acondicionamientos de efecto submieloablativo y toxicidad extra-hematológica reducida.
- d) Empleo de trasplantes múltiples.
- e) Infusión intra-medular y otras estrategia igualmente dirigidas a favorecer el anidamiento en los nichos medulares mediante la manipulación de la expresión de moléculas de adhesión u otras acciones.

Por otra parte, la experiencia acumulada desde que el TSCU fuera introducido en la práctica clínica hace casi 20 años ha puesto de manifiesto que, tras el prendimiento, los pacientes mantienen una prolongada situación de déficit de la capacidad del sistema inmune para proporcionar protección frente a las infecciones por patógenos, lo que se traduce en una alta morbi-mortalidad debida a agentes contra los que no se dispone de fármacos anti-microbianos eficaces o cuya eficacia se ve limitada precisamente por la falta de desarrollo de mecanismos inmunes eficientes.

Los factores reconocidos como contribuyentes a esta deficiencia de la inmunidad protectora, o sospechosos de serlo, guardan relación con el carácter “naive” de los linfocitos infundidos con el TSCU, así como con una pobre neogénesis de linfocitos T a partir de los precursores pre-tímicos contenidos en el *inoculum* de SCU (cuyo contenido es muy bajo) y, en último término, el déficit de la capacidad funcional del timo en el receptor, por razón de edad y/o efecto de los tratamientos antitumorales

previamente administrados y los efectos del tratamiento acondicionante. El empleo de globulina anti-linfocito o anti-timocito es un factor con un efecto adicional, por su acción depleccionadora *in vivo* de linfocitos del *inoculum*.

La estrategia de uso de unidades de alto contenido celular y alto grado de compatibilidad HLA es de eficacia limitada, en cuanto que es factible casi exclusivamente a la población de pacientes pediátricos, que constituye la minoría de posibles candidatos, dada la limitación del volumen de la SCU que puede ser recogida de los vasos placentarios después de la separación del recién nacido, siendo el caso que sólo 1/3 aproximadamente de las colectas contienen más de 900 millones de CNT, aparte de que la mayor compatibilidad HLA conlleva menos EICT, como resulta demostrado por las observaciones de diferencias de incidencia de recidivas en distintas series de TSCU en función del grado de compatibilidad HLA.

Consecuentemente, mejores perspectivas prácticas de mejorar los resultados del TSCU, haciéndolo utilizable para una más amplia gama de pacientes por razón de patología y/o edad, las presentan las estrategias dirigidas a:

1. Reducir la toxicidad inducidas por el tratamiento preparativo o acondicionante,
2. Facilitar la reconstitución hematopoyética reduciendo los tiempos de citopenia post-trasplante con TSCU con unidades de relativa bajo contenido celular respecto al peso del paciente; y
3. Facilitar la recuperación de la capacidad de defensa inmunológica frente a patógenos.

Nuestra primera aproximación al problema de potenciar el prendimiento fue la de co-infundir junto con una unidad de SCU, las células resultantes de cultivos de expansión exvivo de todas las progenitores recuperables de una segunda unidad ⁴³, esperando acortar el tiempo de neutropenia por la infusión de un mayor número de PH posiblemente conteniendo una proporción relativamente alta de PH en estadio madurativo relativamente avanzado. La disponibilidad con esta estrategia de marcadores para determinar la procedencia de las células tras el injerto nos hizo cuestionar, ya en el año 1999, el potencial práctico de las estrategias de someter una alícuota de la unidad a

trasplantar a cultivo previo exvivo con propósito de conseguir expansión de la población de células progenitoras contenida en la misma antes de su infusión. La continuación de investigaciones en esta línea, de expansión pre-trasplante, utilizando diferentes condiciones de cultivo no se ha traducido hasta el presente en resultados de utilidad clínica.

En cambio de gran utilidad práctica al ser altamente eficaz para garantizar altas tasas de prendimiento y de QCC incluso tras el trasplante de unidades de contenido celular relativamente bajo (tanto como del orden de 1.5×10^7 CNT/Kg.), se ha probado en nuestras manos, como lo demuestran los resultados mostrados en este trabajo de Tesis, nuestra estrategia de “trasplante dual”.

Son elementos básicos de esta estrategia:

- a) el empleo de regímenes preparativos o de acondicionamiento de reducida toxicidad extra-hematológica pero de potente efecto supresor del sistema inmune del receptor y de potente efecto antitumoral a la vez que mieloablativo; y
- b) la co-infusión de un número relativamente bajo células PHM obtenidas de un donante, elegible sin restricción HLA, por procedimientos de aféresis y de selección como células CD34+ o CD133+, con contenido extremadamente bajo de linfocitos T en el producto infundido.

Con la estrategia del “trasplante dual” se obtiene prendimiento precoz de células del donante auxiliar, que se traduce en precoz recuperación de granulocitos por células de este donante, de marcado efecto protector frente a infecciones facilitadas por neutropenia prolongada, amen de posible disminución de las necesidades transfusionales según puede colegirse del hecho de que se produce también precoz elevación de la tasa de reticulocitos y precoz presencia de megacariocitos en la médula (datos no mostrados), supuestamente también derivados de las células del donante auxiliar. Bajo el efecto protector de este prendimiento de las células del donante auxiliar, el paciente se mantiene en condiciones favorables durante el tiempo necesario para que el TSCU tenga oportunidad de prendimiento. El posterior prendimiento del TSCU da lugar al reemplazo del trasplante del donante auxiliar, verosíblemente por mecanismos inmunológicos a juzgar por la cinética de evolución del quimerismo tras un

segundo TSCU en los casos en los que se ha producido fallo del administrado inicialmente o rechazo precoz del mismo.

Fallo del injerto de las células del donante auxiliar se registró en 6 de los 46 pacientes trasplantados, de los cuales uno correspondió a una paciente que presentaba polisensibilización a antígenos HLA y 4 a los únicos casos en que se utilizó a la madre del paciente como donante auxiliar. Esta observación no es relacionable con sensibilización de los receptores a los llamados NIMA (“non inherited maternal HLA antigens”) en tanto que estos son compartidos por muchos de los donantes auxiliares haploidénticos no maternos. Aunque en nuestros casos no disponemos de datos que puedan considerarse indicativos de que esta observada falta de eficacia de los donantes maternos, pueda relacionarse con mecanismos inmunológicos, es verosímil que pueda haberlos a tenor de la descripción por Goulmy^{91,92} de la frecuente sensibilización de individuos humanos a antígenos menores de histocompatibilidad maternos.

En un paciente del estudio no hubo prendimiento de la unidad de SCU inicialmente trasplantada, lo que fue debido a que la misma resultó carente de progenitores hematopoyéticos viables y en otro paciente se produjo pérdida precoz del injerto del TSCU. En ambos casos el prendimiento de las células del donante auxiliar mantuvo niveles de CAN prácticamente normales durante todo el tiempo hasta el prendimiento de un segundo TSCU administrado tras intervalos de 34 y 60 días. En ambos casos el prendimiento del segundo TSCU fue seguido de la desaparición de células del donante auxiliar. Estos datos son, por una parte, demostrativos del efecto de soporte proporcionado por el prendimiento de las células del donante auxiliar y, por otra, muy sugerentes de que la desaparición del injerto del donante auxiliar pueda ser debido a rechazo por parte del sistema inmunológico desarrollado a partir el TSCU.

Según muestran nuestros datos, la estrategia del “trasplante dual” tiene como resultado de mayor interés práctico, una alta tasa de prendimientos y de QCC en TSCU hechos incluso con unidades de relativamente bajo contenido celular y hasta 2 disparidades HLA A y B antigénicas y DRB1 a nivel alélico. (Tablas 7 y 8 y Figuras 6). Ello implica un aumento considerable del número de unidades de SCU disponibles en los inventarios de los Bancos utilizables para pacientes adultos y/o de alto peso corporal, con aumento

considerable del número de pacientes con posibilidad de beneficiarse de TSCU (Tabla 12).

De mayor interés es conocer las interacciones de orden inmunológico que puede haber en el receptor de TSCU realizado con la estrategia del “trasplante dual”. La baja frecuencia e intensidad de las manifestaciones de EICH podrían ser sugerentes de la posibilidad de la inducción de inmunotolerancia del TSCU hacia el receptor por la exposición durante el desarrollo de su prendimiento de una diversidad de alelos HLA. No disponemos de datos que puedan documentar esta posibilidad, cuyo estudio “ex vivo” presenta importantes dificultades. En pacientes que desarrollaron EICH agudo con manifestaciones cutáneas en los que se hizo análisis del ADN de las biopsias cutáneas pudo demostrarse ADN del TSCU, pero no ADN del donante auxiliar en ninguno de los casos. La presencia de ADN del donante auxiliar, de encontrarse, podría provenir de linfocitos T maduros en el *inoculum* o de los de neogénesis en el supuesto de fallo de los mecanismos de selección tímica en el receptor.

La mayor parte de los casos de EICH aguda han sido grado I-II y han respondido favorablemente a los esteroides, mientras que en 3 casos fue la principal causa de muerte. El empleo de ATG en los regímenes de acondicionamiento utilizados está orientado, más que a inducir tolerancia del trasplante, a ejercer efecto purga frente a los linfocitos del TSCU como maniobra de profilaxis de EICH, que, evidentemente, puede ser factor contribuyente al déficit de la inmunidad protectora frente a patógenos, efecto que se ha tratado de minimizar reduciendo las dosis de estos agentes. En 2 pacientes se prescindió de su uso por concurrir circunstancias (alto riesgo de recidiva e infección fúngica previa) que lo hacían especialmente aconsejable. Uno de ellos desarrolló EICH agudo grave, siendo uno de los 3 pacientes fallecidos por esta causa.

La descripción del efecto modulador de la reconstitución inmune ejercido por las llamadas células mesenquimales (MSC) ha dado lugar a que se ensaye su aplicación al TSCU. En el contexto del “trasplante dual” cabe la posibilidad de utilizar el mismo donante auxiliar como donante de MSC que co-infundidas en el TSCU con los PHM auxiliares podrían tener efecto inhibitor del riesgo de EICH aparte de posibles acciones favorables sobre el desarrollo de la inmunidad protectora y el EICH, que podría permitir la supresión del empleo del ATG como parte del tratamiento acondicionante. Además

De la posibilidad de su uso como agente terapéutico de la EICH establecida y refractaria a esteroides. Investigaciones en este sentido han sido iniciadas por en el Hospital Universitario Puerta de Hierro con resultados iniciales alentadores (datos no mostrados).

Tabla 12.-Incremento de la disponibilidad de unidades de SCU de los inventarios de los Bancos para el Trasplante de Adultos con alta probabilidad de Prendimiento en función del mínimo de CNT/Kg utilizable.

CNT x 10 ⁶ en la Unidad de SCU	Peso máximo (Kg) del receptor para un mínimo de 2.5 x 10 ⁷ CNT/Kg	Peso máximo (Kg) del receptor para un mínimo de 1.5 x 10 ⁷ CNT/Kg
100	4	6,6
200	8	13,2
300	16	19,8
400	20	26,4
500	24	33
600	28	39,6
700	32	46,2
800	36	52,8
900	40	59,4
1100	44	66
1200	48	72,6
1300	52	85,8
1400	56	92,4
1500	60	99

Para un paciente de 60 Kg el procedimiento del Trasplante Dual permite utilizar Unidades con un mínimo de 900 millones de CNT (precongelación) con más del 95% de probabilidades de alcanzar un QCC antes de 100 días incluso con dos diferencias HLA, en tanto que con para TSCU convencional con similar grado de compatibilidad HLA se precisa, para una alta probabilidad de prendimiento y QCC, de unidades con un mínimo de 1,500 millones de CMN. Consecuentemente, el procedimiento del Trasplante Dual aumenta muy considerablemente la posibilidad de encontrar una unidad trasplantable en el inventario de la red internacional de Bancos de SCU acreditados.

La baja incidencia de recidivas observada, tratándose de una población de pacientes con procesos oncohematológicos de alto riesgo de recidiva es indicativa del importante EICT asociado al TSCU realizado con la metodología del “trasplante dual”. La no disponibilidad del donante en los TSCU de donante no relacionado impide que pueda recurrirse al mismo, para usar infusiones linfocitarias (ILD). La posibilidad de utilizar, con este fin, poblaciones seleccionadas de linfocitos del donante auxiliar (linfocitos NK

de donante Kir-ligando compatible con el TSCU e incompatible con el paciente o linfocitos T depleccionados de los alo-reactivos) cabe ser investigada en el contexto del “trasplante dual”.

Siendo baja la incidencia de recidivas, la mortalidad observada corresponde fundamentalmente a causas relacionadas con el procedimiento (MRT), en su mayor parte a infecciones, toxicidad e EICH, siendo de destacar que en la serie objeto de nuestro estudio sólo se registró un fallecimiento atribuible a fallo de prendimiento (un importante factor de MRT en los TSCU al modo convencional) siendo de señalar que el mismo ocurrió en un paciente multi-tratado con probable déficit funcional del estroma hematopoyético.

La principal causa de morbilidad en los pacientes objeto del estudio fueron las infecciones desarrolladas tras el prendimiento y debidas a gérmenes oportunistas, fundamentalmente por reactivaciones endógenas, relacionables con el déficit de la inmunidad protectora dependiente de la tardía reconstitución de la población de linfocitos T, especialmente de los CD4+. Los datos de los análisis de TRECs son indicativos que en los pacientes objeto del estudio, ha habido contribución de neogénesis tímica, o extra-tímica, a partir de progenitores pre-tímicos del TSCU, al desarrollo de poblaciones linfocitarias T. Puede considerarse que es de gran interés realizar estudios para investigar la posibilidad de estimular esta neogénesis. Entre las acciones que pueden considerarse que puedan tener efecto favorable en este sentido, podrían estar la protección del timo frente a la ICT de los tratamientos acondicionantes, el empleo de GM-CSF como estimulante de las células epiteliales del timo, o el uso de LH-RH como bloqueante de las hormonas gonadales, dadas las observaciones de incremento de la producción de linfocitos T en pacientes sometidos a este tratamiento por cáncer de próstata (^{93, 94}). El empleo de IL7 puede conllevar riesgo de producir EICH por expansión de los linfocitos post-tímicos del TSCU.

La mayor incidencia de infecciones oportunistas ha correspondido a CMV. El desarrollo de EICH aguda y su tratamiento con esteroides son factores reconocidos como facilitadores del desarrollo de reactivaciones de CMV añadidos al efecto del uso de ALG o ATG. Los pacientes seropositivos presentan prácticamente en todos los casos episodios de activación del virus detectable por pruebas de PCR y/o antigenemia, que

con la mayor frecuencia responden al tratamiento con Ganciclovir y/o Foscarnet, aunque con tendencia a recaer, a pesar de la presencia de anticuerpos Anti-CMV IgM, que es relacionable con déficit de linfocitos T CMV específicos. Sin embargo, la progresiva disminución de la incidencia de reactivaciones a partir del tercer mes es muy sugerente del progresivo desarrollo de inmunidad protectora en paralelo con la recuperación de las poblaciones CD4+ y CD8+ y el cambio de predominio de los de inmunofenotipo “naive” por los de inmunofenotipo memoria y efector. Es de señalar que nuestros datos de reconstitución de las subpoblaciones con distintos inmunofenotipos son similares a los obtenidos por otros autores en TSCU sin co-infusión de células de donante auxiliar.

El tratamiento de las infecciones CMV se ve facilitado en los receptores de trasplante dual en cuanto que la pronta recuperación de los granulocitos debido al prendimiento de las células del donante auxiliar permite el empleo del Ganciclovir en el primer trimestre post-trasplante. La posibilidad de utilizar linfocitos T CMV específicos del donante auxiliar CMV seropositivos como procedimiento de inmunoterapia adoptiva para el tratamiento de infecciones CMV refractarias a los fármacos antivirales merece ser investigada.

Las infecciones que han sido causa de muerte de pacientes incluyen CMV, EBV (causante de SLP), Toxoplasma, Tripanosoma y Cándida. Otras infecciones que han sido importante causa de morbilidad, pero que no han sido causa de muerte e incluyen Leishmaniasis y las de HBV, Poliomavirus, HV-6, HZV, y Tuberculosis (supuestamente por reactivaciones endógenas) siendo de señalar la falta de observaciones, en los pacientes objeto de este estudio, de infecciones por hongos filamentosos y la baja incidencia de infecciones bacterianas determinantes de riesgo vital. Son de señalar, además, la aparente eficacia de la profilaxis frente a Toxoplasma (introducida en el estudio a partir de 2004), el curso favorable que la mayoría de las infecciones por Poliomavirus sin tratamiento antiviral específico, la respuesta favorable de las reactivaciones de HBV a tratamiento con antivirales e IFN y el mantenimiento bajo control del único caso de Leishmaniasis con tratamiento continuado con Ambisome. Del caso de infección por Tripanosoma es de significar que fue el segundo caso descrito en España en receptores de TPH, cuyo estudio epidemiológico dio lugar a que se instauraran en nuestro país las

medidas específicas para valorar el riesgo de contagiosidad en la población de donantes de sangre.⁽⁹⁵⁾

Los fallecimientos por toxicidad corresponden a los primeros casos incluidos en el estudio, que eran pacientes muy tratados y/o que recibieron acondicionamiento con dosis alta de ICT (régimen “a”). La toxicidad presentó características de EVO en 2, de FMO en 3 y de infarto cerebral en un caso.

Traducción de la cinética de prendimiento de las causas de mortalidad son curvas actuariales de supervivencia global y de SLE en nuestro que comparan favorablemente con los resultados de otros estudios de TSCU en adultos con patología oncohematológica de alto riesgo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La estrategia del trasplante dual ofrece la posibilidad de utilizar unidades de relativamente bajo contenido celular y hasta 2/6 diferencias HLA con alta probabilidad de conseguir prendimiento y QCC. De ello resulta la posibilidad de encontrar en los inventarios de la red internacional de Bancos acreditados, unidades trasplantables para la gran mayoría de los pacientes, tanto pediátricos como adultos.
- 2.- Nuestra trabajo pone de manifiesto que la estrategia del “trasplante dual” no supone mayor riesgo de EICH ni efectos adversos sobre el desarrollo del sistema inmune.
- 3.- La baja morbilidad relacionable con el tiempo de citopenia post-trasplante, la alta probabilidad de prendimiento y de QCC y el bajo riesgo de EICH grave y refractario, permite considerar la opción del TSCU para el tratamiento de pacientes de amplio rango de edad y con co-morbilidades.
- 4.- Ninguna de las estrategias alternativas hasta ahora ensayadas (tratamientos submieloablativos y/o múltiples trasplantes, infusiones intra-medulares) han proporcionado resultados de prendimiento, de QCC y supervivencia o SLE que puedan considerarse superiores a los que proporciona la estrategia del “trasplante dual” tras tratamiento acondicionante mieloablativo de toxicidad extra-hematológica reducida.
- 5.- Conseguida con la estrategia del “trasplante dual” una alta tasa de prendimientos y QCC, el TSCU pasa a tener como objetivo prioritario conseguir la reducción de los riesgos inherentes a un desarrollo tardío o pobre de la capacidad de defensa inmunológica activa del paciente frente a patógenos, amén de potenciar su EICT sin incrementar el riesgo de EICH.
- 6.- Aparte de los efectos favorables demostrados, la estrategia del “trasplante dual” con co-infusión de células auxiliares obtenidas de donante voluntario sin restricción HLA presenta posibilidades para distintas acciones de I+D, entre las que en este momento cabe considerar como susceptibles de investigación traslacional realizables de forma inmediata:

- a) Uso de células inmunoreguladoras obtenidas del donante auxiliar, complementarias de los PH, para tratar de conseguir acciones moduladoras de la respuesta inmune de posibles efectos favorables, entre las que caben considerar MSC y T-regs.; su uso puede ser de utilidad para profilaxis de la EICH, con posibilidad de eliminar la necesidad de uso de ATG, así como ejercer terapia eficaz contra la EICH establecida.
- b) Uso de células NK del donante auxiliar en casos de incompatibilidad KIR-ligando con el receptor y compatibilidad con el implante de TSCU, especialmente para el tratamiento de pacientes con procesos mieloproliferativos de alto riesgo de recidiva
- c) Posibilidad de co-infundir células T deplecionadas de las alo-reactivas frente al receptor para inducir efecto ICT
- d) Posibilidad de infusión en una primera fase del procedimiento, tras tratamiento preparativo inmunosupresor, de células T no preseleccionadas al objeto de inducir efecto ICT, dada la posibilidad de abrogar el desarrollo de EICH en una segunda fase del procedimiento con la eliminación de los linfocitos T implantados mediante la administración de potente tratamiento inmunosupresor y TSCU
- e) Co-infusión de células dendríticas obtenidas a partir de monocitos del donante pulsadas con antígenos microbianos para inducir inmunidad activa en el receptor
- f) Procedimientos de inmunoterapia adoptiva utilizando células T del donante específicas contra patógenos (por ejemplo CMV)

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Knudtson S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*. 1974;43:357-361
2. Broxmeyer HE, Cooper S, Yoder M, Hangoc G. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;177:195-204
3. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3828-3832
4. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174-1178
5. Kurtzberg J, Graham M, Casey J, Olson J, Stevens CE, Rubinstein P. The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hemopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells*. 1994;20:275-283; discussion 284
6. Ballen KK. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005;105:3786-3792
7. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocchi G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 1996;335:157-166
8. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*. 1997;337:373-381
9. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*. 1998;339:1565-1577
10. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, Gluckman E. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. 2000;342:1846-1854
11. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NK, Davies SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002;100:1611-1618
12. Barker JN, Davies SM, DeFor T, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood*. 2001;97:2957-2961

13. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*. 1995;346:214-219
14. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood*. 1999;93:3662-3671
15. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, Brichard B, Li X, Nagler A, Giorgiani G, Haut PR, Brochstein JA, Nugent DJ, Blatt J, Woodard P, Kurtzberg J, Rubin CM, Miniero R, Lutz P, Raja T, Roberts I, Will AM, Yaniv I, Vermynen C, Tannoia N, Garnier F, Ionescu I, Walters MC, Lubin BH, Gluckman E. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood*. 2003;101:2137-2143
16. Michel G, Rocha V, Chevret S, Arcese W, Chan KW, Filipovich A, Takahashi TA, Vowels M, Ortega J, Bordigoni P, Shaw PJ, Yaniv I, Machado A, Pimentel P, Fagioli F, Verdeguer A, Jouet JP, Diez B, Ferreira E, Pasquini R, Rosenthal J, Sievers E, Messina C, Iori AP, Garnier F, Ionescu I, Locatelli F, Gluckman E. Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis. *Blood*. 2003;102:4290-4297
17. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2001;344:1815-1822
18. Sanz GF, Saavedra S, Planelles D, Senent L, Cervera J, Barragan E, Jimenez C, Larrea L, Martin G, Martinez J, Jarque I, Moscardo F, Plume G, Andreu R, Regadera AI, Garcia I, Molla S, Solves P, de La Rubia J, Bolufer P, Benlloch L, Soler MA, Marty ML, Sanz MA. Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood*. 2001;98:2332-2338
19. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Nagayama H, Ishii K, Ito K, Sato H, Takahashi T, Shindo M, Sekine R, Ohno N, Uchimar K, Nagamura F, Shirafuji N, Tojo A, Tani K, Asano S. A clinical comparison of unrelated cord blood transplantation and unrelated bone marrow transplantation for adult patients with acute leukaemia in complete remission. *Br J Haematol*. 2002;118:140-143
20. Long GD, Laughlin M, Madan B, Kurtzberg J, Gasparetto C, Morris A, Rizzieri D, Smith C, Vredenburgh J, Halperin EC, Broadwater G, Niedzwiecki D, Chao NJ. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9:772-780
21. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Takasugi K, Uchiyama M, Konuma T, Futami M, Nomura A, Nakayama S, Soda Y, Ohno N, Nagamura F, Uchimar K, Tojo A, Tani K, Asano S. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in patients over the age of 45 years. *Br J Haematol*. 2004;126:711-714
22. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Takasugi K, Shimohakamada Y, Yamada T, Ishii K, Ohno N, Nagamura F, Uchimar K, Tojo A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:489-491
23. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Ishii K, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Uchimar K, Nagamura F, Tojo A, Asano S. Unrelated

cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2003;101:4711-4713

24. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, Stevens C, Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DI, van Rood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:2265-2275

25. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, Jacobsen N, Ruutu T, de Lima M, Finke J, Frassoni F, Gluckman E. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:2276-2285

26. Sanz MA. Cord-blood transplantation in patients with leukemia--a real alternative for adults. *N Engl J Med*. 2004;351:2328-2330

27. Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Tomonari A, Takasugi K, Shimohakamada Y, Yamada T, Uchimar K, Tojo A, Shirafuji N, Kodo H, Tani K, Takahashi T, Yamaguchi T, Asano S. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2004;104:3813-3820

28. Gluckman E. Cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:808-812

29. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, Loberiza FR, Champlin RE, Klein JP, Horowitz MM, Wagner JE. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. 2007;369:1947-1954

30. Tse W, Laughlin MJ. Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:377-383

31. Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:565-570

32. Komatsu T, Narimatsu H, Yoshimi A, Kurita N, Kusakabe M, Hori A, Murashige N, Matsumura T, Kobayashi K, Yuji K, Tanaka Y, Kami M. Successful engraftment of mismatched unrelated cord blood transplantation following reduced intensity preparative regimen using fludarabine and busulfan. *Ann Hematol*. 2007;86:49-54

33. Majhail NS, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Brunstein CG, Burns LJ. Comparable results of umbilical cord blood and HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation after reduced-intensity preparative regimen for advanced Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107:3804-3807

34. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood*. 2003;102:1915-1919

35. Yuji K, Miyakoshi S, Kato D, Miura Y, Myojo T, Murashige N, Kishi Y, Kobayashi K, Kusumi E, Narimatsu H, Hamaki T, Matsumura T, Kami M, Fukuda T, Masuo S, Masuoka K, Wake A, Ueyama J, Yoneyama A, Miyamoto K, Nagoshi H, Matsuzaki M, Morinaga S, Muto Y, Takeue Y, Taniguchi S. Reduced-intensity unrelated cord blood transplantation for patients with advanced malignant lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:314-318

36. Narimatsu H, Kami M, Miyakoshi S, Murashige N, Yuji K, Hamaki T, Masuoka K, Kusumi E, Kishi Y, Matsumura T, Wake A, Morinaga S, Kanda Y, Taniguchi S. Graft failure following reduced-intensity cord blood transplantation for adult patients. *Br J Haematol*. 2006;132:36-41

37. Del Toro G, Satwani P, Harrison L, Cheung YK, Brigid Bradley M, George D, Yamashiro DJ, Garvin J, Skerrett D, Bessmertny O, Wolownik K, Wischhover C, van de Ven C, Cairo MS. A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:613-622
38. Chao NJ, Koh LP, Long GD, Gasparetto C, Horwitz M, Morris A, Lassiter M, Sullivan KM, Rizzieri DA. Adult recipients of umbilical cord blood transplants after nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:569-575
39. Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:354-371
40. Kogler G, Nurnberger W, Fischer J, Niehues T, Somville T, Gobel U, Wernet P. Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:397-403
41. Pecora AL, Stiff P, Jennis A, Goldberg S, Rosenbluth R, Price P, Goltry KL, Douville J, Armstrong RD, Smith AK, Preti RA. Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:797-799
42. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, Perissinotto E, Cavalloni G, Kollet O, Lapidot T, Aglietta M. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood.* 1999;93:3736-3749
43. Fernandez MN, Granena A, Millan I, Regidor C, Cabrera R, Querol S, Garcia J. Evaluation of engraftment of ex vivo expanded cord blood cells in humans. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25 Suppl 2:S61-67
44. de Lima M, Shpall E. Strategies for widening the use of cord blood in hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2006;91:584-587
45. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm J, Ward W, McNiece IK. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:368-376
46. McNiece I. Ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2004;32:409-410
47. Guenechea G, Segovia JC, Albella B, Lamana M, Ramirez M, Regidor C, Fernandez MN, Bueren JA. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood.* 1999;93:1097-1105
48. Robinson S, Niu T, de Lima M, Ng J, Yang H, McMannis J, Karandish S, Sadeghi T, Fu P, del Angel M, O'Connor S, Champlin R, Shpall E. Ex vivo expansion of umbilical cord blood. *Cytotherapy.* 2005;7:243-250
49. Yao CL, Chu IM, Hsieh TB, Hwang SM. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol.* 2004;32:720-727
50. Prince HM, Simmons PJ, Whitty G, Wall DP, Barber L, Toner GC, Seymour JF, Richardson G, Mrongovius R, Haylock DN. Improved haematopoietic recovery following transplantation with ex vivo-expanded mobilized blood cells. *Br J Haematol.* 2004;126:536-545
51. Peled T, Mandel J, Goudsmid RN, Landor C, Hasson N, Harati D, Austin M, Hasson A, Fibach E, Shpall EJ, Nagler A. Pre-clinical development of cord blood-

derived progenitor cell graft expanded ex vivo with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy*. 2004;6:344-355

52. Song K, Sun X, Wang J, Zhou S, Zeng H, Chen F. Role of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in the homing of umbilical cord blood, mobilized peripheral blood and bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Res*. 2007

53. Song K, Sun X, Wang J, Chen F. How Glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D acts in homing of hematopoietic stem/progenitor cells? *Med Hypotheses*. 2007

54. Zheng Y, Watanabe N, Nagamura-Inoue T, Igura K, Nagayama H, Tojo A, Tanosaki R, Takaue Y, Okamoto S, Takahashi TA. Ex vivo manipulation of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their trans migratory potential. *Exp Hematol*. 2003;31:1237-1246

55. Abstracts of the American Society of Hematology 48th Annual Meeting, December 9-12, 2006, Orlando, Florida, USA. *Blood*. 2006;108:3b-482b

56. Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39:11-23

57. Kang HJ, Kho SH, Jang MK, Lee SH, Shin HY, Ahn HS. Early engraftment kinetics of two units cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:197-201

58. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Mulder A, Claas FH, Noort WA, Willemze R, Fibbe WE. Enhanced engraftment of umbilical cord blood-derived stem cells in NOD/SCID mice by cotransplantation of a second unrelated cord blood unit. *Exp Hematol*. 2005;33:1249-1256

59. Fernandez MN, Regidor C, Cabrera R, Garcia-Marco JA, Fores R, Sanjuan I, Gayoso J, Gil S, Ruiz E, Little AM, McWhinnie A, Madrigal A. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive cotransplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol*. 2003;31:535-544

60. Magro E, Regidor C, Cabrera R, Sanjuan I, Fores R, Garcia-Marco JA, Ruiz E, Gil S, Bautista G, Millan I, Madrigal A, Fernandez MN. Early hematopoietic recovery after single unit unrelated cord blood transplantation in adults supported by co-infusion of mobilized stem cells from a third party donor. *Haematologica*. 2006;91:640-648

61. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, Kotylo P, Brahmi Z, Smith FO. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. 2000;96:2703-2711

62. Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, Chan KW, Porcher R, Michel G, Ortega JJ, Wernet P, Gobel U, Gluckman E, Locatelli F. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br J Haematol*. 2001;114:42-48

63. Klein AK, Patel DD, Gooding ME, Sempowski GD, Chen BJ, Liu C, Kurtzberg J, Haynes BF, Chao NJ. T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7:454-466

64. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, Giraldi E, Busca A, Montagna D, Miniero R, Comoli P, Giorgiani G, Zecca M, Pagani S, Locatelli F. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol*. 2001;29:371-379

65. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Betts MR, Collins RH, Douek DC. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97:1458-1466
66. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, Ruggeri L, Barbabietola G, Aristei C, Latini P, Reisner Y, Martelli MF. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998;339:1186-1193
67. Ramirez M, Regidor C, Marugan I, Garcia-Conde J, Bueren JA, Fernandez MN. Engraftment kinetics of human CD34+ cells from cord blood and mobilized peripheral blood co-transplanted into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:271-275
68. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81:1390-1397
69. Bolanos-Meade J, Vogelsang GB. Mesenchymal stem cells and organ transplantation: current status and promising future. *Transplantation*. 2006;81:1388-1389
70. Taupin P. OTI-010 Osiris Therapeutics/JCR Pharmaceuticals. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006;7:473-481
71. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9:1144-1150
72. Hess AD. Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:13-21
73. Verbsky JW. Therapeutic use of T regulatory cells. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19:252-258
74. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest*. 2007;117:1167-1174
75. Nguyen VH, Zeiser R, Negrin RS. Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:995-1009
76. Zorn E. CD4+CD25+ regulatory T cells in human hematopoietic cell transplantation. *Semin Cancer Biol*. 2006;16:150-159
77. Passweg JR, Stern M, Koehl U, Uharek L, Tichelli A. Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:637-643
78. Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, Borleri G, Conti E, Golay J, Rambaldi A. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:621-627
79. Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, Zitvogel L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev*. 2006;214:229-238
80. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10119-10122

81. Foot AB, Garin YJ, Ribaud P, Devergie A, Derouin F, Gluckman E. Prophylaxis of toxoplasmosis infection with pyrimethamine/sulfadoxine (Fansidar) in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14:241-245
82. Arguello JR, Little AM, Pay AL, Gallardo D, Rojas I, Marsh SG, Goldman JM, Madrigal JA. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet.* 1998;18:192-194
83. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia.* 2001;15:293-302
84. Virts EL, Phillips JA, Thoman ML. A novel approach to thymic rejuvenation in the aged. *Rejuvenation Res.* 2006;9:134-142
85. Fallen PR, Duarte RF, McGreavey L, Potter M, Ethell M, Prentice HG, Madrigal JA, Travers PJ. Identification of non-naïve CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:609-616
86. Fallen PR, McGreavey L, Madrigal JA, Potter M, Ethell M, Prentice HG, Guimaraes A, Travers PJ. Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:1001-1014
87. Jimenez M, Martinez C, Ercilla G, Carreras E, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Villamor N, Amezcua N, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Gaya A, Martino R, Sierra J, Montserrat E. Reduced-intensity conditioning regimen preserves thymic function in the early period after hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2005;33:1240-1248
88. Uhm JE, Kim K, Lim TK, Park BB, Park S, Hong YS, Lee SC, Hwang IG, Koh KC, Lee MH, Ahn JS, Kim WS, Jung CW, Kang WK. Changes in serologic markers of hepatitis B following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:463-468
89. Endo T, Sawada K, Fujimoto K, Yamamoto S, Takashima H, Haseyama Y, Nishio M, Koizumi K, Koike T. [Reactivation of hepatitis B virus after autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with positive hepatitis B surface antibodies]. *Rinsho Ketsueki.* 2000;41:322-328
90. Goyama S, Kanda Y, Nannya Y, Kawazu M, Takeshita M, Niino M, Komeno Y, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Shiratori Y, Hirai H. Reverse seroconversion of hepatitis B virus after hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma.* 2002;43:2159-2163
91. Mommaas B, Stegehuis-Kamp JA, van Halteren AG, Kester M, Enczmann J, Wernet P, Kogler G, Mutis T, Brand A, Goulmy E. Cord blood comprises antigen-experienced T cells specific for maternal minor histocompatibility antigen HA-1. *Blood.* 2005;105:1823-1827
92. Goulmy E. Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Hum Immunol.* 2006;67:433-438
93. Roden AC, Moser MT, Tri SD, Mercader M, Kuntz SM, Dong H, Hurwitz AA, McKean DJ, Celis E, Leibovich BC, Allison JP, Kwon ED. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *J Immunol.* 2004;173:6098-6108
94. Olsen NJ, Kovacs WJ. Effects of androgens on T and B lymphocyte development. *Immunol Res.* 2001;23:281-288

95. R. Forés, I. Sanjuán, F. Portero, E. Ruiz, C. Regidor, R. López-Vélez, M. Linares, S. Gil, E. Ojeda, I. Krsnik, G. Bautista, C. Vallejo, J. García-Marco, MN Fernández, R. Cabrera. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2007;39:127-128.